

**INFRAROT - SPEKTROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER
IN - VIVO BLUTZUCKERKONZENTRATION**

HUBERT ZELLER

1987

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. E. Buchborn

**I n f r a r o t - S p e k t r o s k o p i s c h e
U n t e r s u c h u n g e n z u r B e s t i m m u n g d e r
i n - v i v o B l u t z u c k e r k o n z e n t r a t i o n**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hubert Zeller

aus

Freiburg im Breisgau

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Landgraf

Mitberichterstatter:

1. Prof. Dr. E. Buchborn

2. Prof. Dr. P. Schwandt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter

Dr. P. Novak

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

16.07.1987

Meinen Eltern

Meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

Danksagung

- Herrn Prof. Dr. Landgraf danke ich für die Überlassung des Themas, für seine ständige Bereitschaft zum Gespräch und seine wertvollen Anregungen.
- Bei Herrn Prof. Dr. Ruge bedanke ich mich für die Genehmigung zur Benutzung aller Einrichtungen seines Institutes, die zur Entstehung dieser Arbeit erforderlich waren.
- Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Novak für die Korrektur dieser Arbeit und seine stets kollegiale und freundliche Unterstützung.
- Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Knözinger, mit dessen freundlicher Genehmigung und bereitwilliger Hilfe die Spektren des nahen Infrarot-Bereiches in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Physikalische Chemie der Universität München aufgenommen werden konnten.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsübersicht

1. Allgemeine Einleitung	
1.1 Stand der Technik der in-vivo Glucosebestimmung	1
1.2 Aufgabenstellung	5
2. Grundlagen der IR-Spektroskopie	7
3. Material und Methode	12
3.1 IR-Spektrophotometer	12
3.2 Küvetten	13
3.3 Meßmethoden	16
Teil I: Absorption von Glucose	17
1. Die Absorptionsspektren von H_2O , Glucose und Blut im mittleren Infrarot-Bereich (MIR)	17
1.1 Einleitung	17
1.2 Experimentelle Bedingungen	17
1.3 Meßergebnisse und Diskussion	18
1.3.1 H_2O	18
1.3.2 Glucose	20
1.3.3 Blut	26
2. Die Absorptionsspektren von H_2O , Glucose und Blut im nahen Infrarot (NIR)	28
2.1 Einleitung	28
2.2 Experimentelle Bedingungen	29
2.3 Ergebnisse und Diskussion	29
2.3.1 H_2O	29
2.3.2 Glucose	31
2.3.3 Blut	34

3. Qualitativer Nachweis der Glucoseabsorption im Blut	36
3.1 Einleitung	36
3.2 Experimentelle Bedingungen	37
3.3 Diskussion der Ergebnisse	38
3.3.1 Hohe Blutglucosekonzentration	38
3.3.2 Meßreihe im hyperglykämischen Bereich	40

Teil II: Absorption der restlichen IR-aktiven Bestandteile im Blut 44

1. Bestimmung der Absorptionsspektren der Bluteiweiße und des Harnstoffs 44

1.1 Einleitung	44
1.2 Experimentelle Bedingungen	45
1.3 Ergebnisse und Diskussion	46
1.3.1 Hämoglobin	46
1.3.2 Albumin	50
1.3.3 α -, β -Globulin	52
1.3.4 γ -Globulin	55
1.3.5 Harnstoff	57

2. Vergleich der Spektren von Hämoglobin, Blut, Plasma und einer Eiweißlösung 59

2.1 Einleitung	59
2.2 Experimentelle Bedingungen	61
2.3 Ergebnisse und Diskussion	62
2.3.1 Blut - Hämoglobin	62
2.3.2 Blut - Plasma	64
2.3.3 Einweißlösung - Plasma	65

Zusammenfassung 67

Literaturverzeichnis 72

1. Allgemeine Einleitung

1.1. Stand der Technik der in-vivo Glucosebestimmung

Die Behandlung des Diabetes mellitus stellt bis heute trotz oraler Antidiabetika und hoch-gereinigter Insuline in verschiedenen Zubereitungsformen immer noch ein klinisches Problem ersten Ranges dar. Wenn auch die meisten Formen des Altersdiabetes mit den heute zur Verfügung stehenden Medikamenten gut einzustellen sind, so machen doch insbesondere die insulinpflichtigen Diabetesformen, der juvenile Diabetes und die Einstellung vieler diabetischer Patienten unter besonderen Bedingungen wie Schwangerschaft, Operation und diabetisches Koma große Schwierigkeiten.

Als zu Beginn der zwanziger Jahre Insulin erstmals isoliert und einige Zeit später in die Therapie des Diabetes mellitus eingeführt wurde, hielt man in der ersten Euphorie die Zuckerkrankheit für besiegt. Tatsächlich sank die Letalität dank Insulin drastisch, denn nun starb fast niemand mehr im Koma, das zuvor die Haupttodesursache gewesen war [44]. Der Anstieg der Lebenserwartung ließ, trotz scheinbar gut eingestellten Blutzuckers, die Mikro- und Makroangiopathie mit allen ihren Folgen klinisch manifest werden. Obwohl die Ätiologie des diabetischen vaskulären Syndroms noch nicht vollständig geklärt ist, neigt man heute allgemein zu der Ansicht, daß unphysiologische Blutzuckerschwankungen eine bedeutende Rolle spielen [22]. Die stichprobenartigen Blutglucosebestimmungen, selbst das Tagesprofil, vermögen diese Konzentrationsschwankungen nie voll zu erfassen; auch nächtliche Hypoglykämien bleiben sehr oft unerkannt [31].

Aufgrund dieser Problematik liegt der Gedanke nahe, die fehlende oder unvollständige Funktion des endokrinen Pankreas durch einen Apparat zu ersetzen, der in der Lage ist, den Blutzucker in physiologischen Konzentrationsbereichen zu halten. Von diesem Apparat ist zu fordern,

daß er nicht nur im stationären Bereich eingesetzt, sondern auch vom Patienten dauernd getragen werden kann, ohne dessen Wohlbefinden und Bewegungsfreiheit einzuschränken. Am besten wäre die Implantation eines solchen Apparates, ähnlich einem Herzschrittmacher, möglichst klein und von langer Lebensdauer (Abb. 1).

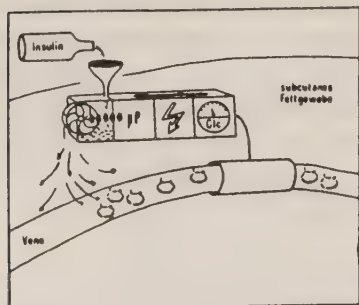


Abb. 1: Prinzip eines implantierbaren künstlichen endokrinen Pankreas mit (von rechts nach links) unblutig messendem Blutglucosesensor, einer Energiequelle, einem Mikroprozessor und einer Insulinpumpe, deren Reservoir bei Bedarf von außen aufzufüllen ist [32]

Den ersten Versuch einer extrakorporalen Blutglucoseregulierung mit einem rechnergesteuerten Rückkopplungssystem machte Kadish im Jahre 1963 [24]. Das Verfahren wurde inzwischen soweit modifiziert, daß kontinuierliche Messungen über mehrere Tage keine Seltenheit mehr darstellen. In einer Kanüle wird Venenblut mit von außen zugeführtem Heparin in konstantem Verhältnis gemischt und einem Glucoseanalyzer zugeleitet. Der nach 60 s zur Verfügung stehende Meßwert wird im Rechner zu dem physiologisch richtigen Infusionssignal für die Insulinpumpe verarbeitet [32]. Die Instabilität der Reagenzien, der Verbrauch von Blut (2,5 ml/h), das dem Körper nicht mehr zur Verfügung steht, und die Größe der Apparatur setzen der extrakorporalen Blutzuckermessung Grenzen.

Mit der Entwicklung von O_2 -Elektroden, die über die Änderung der Sauerstoffkonzentration bei dem enzymatischen Umsatz (GOD) von Gluco-

se und Sauerstoff zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid die Glucosekonzentration messen, war nun die Möglichkeit der intrakorporalen Glucosemessung gegeben. Verschiedene elektronische Glucose-Sensoren wurden von Bessmann und Schultz [3, 4], Chang et al. [12], sowie Shichiri [45] implantiert. Alle Methoden zeichnen sich in-vitro durch hohe Meßgenauigkeit und schnelle Ansprechbarkeit aus. Sie haben allerdings in-vivo nur eine begrenzte Daueranwendbarkeit, da sich ihre Empfindlichkeit durch Anhäufung von Oxidationsprodukten, Proteinfilmbildung, Fibrin- und Thrombozytenanlagerung mit der Zeit zunehmend vermindert. Shichiri ließ die tragbare künstliche Beta-Zelle an sechs Patienten testen. In allen Fällen konnte der Stoffwechsel damit deutlich besser eingestellt werden als mit der ICT (intensivierten konventionellen Insulintherapie) oder mit den nicht-rückgekoppelten Insulin-Infusionspumpen [46]. Ausreichend stabil ist der Sensor allerdings nur drei Tage lang; dann muß er ausgewechselt werden.

Eine weitere Möglichkeit der Glucosebestimmung stellt die Infrarot-Absorptions-Spektroskopie dar. In Abhängigkeit der Konzentration der Glucoselösung wird monochromatisches Licht, das eine Probe durchläuft, abgeschwächt. Man mißt die Intensitäten des einfallenden und des durchgelassenen (nicht absorbierten) Lichts. Im Gegensatz zu den oben angeführten Verfahren, bei welchen der Glucosenachweis nur indirekt über die Reaktionsprodukte erfolgt, findet beim spektroskopischen Nachweis keine Veränderung des Glucosemoleküls statt.

Von Kaiser wird in [25] ein modifiziertes IR-spektroskopisches Verfahren zur Messung der Konzentration wässriger Lösungen vorgeschlagen; die Laser-Absorptions-Spektroskopie mit einer ATR-Platte (Attenuated-Total-Reflection). Der Austausch des konventionellen IR-Generators durch einen Laser verbessert die Meßempfindlichkeit erheblich. Die ATR-Methode ermöglicht es, Ergebnisse von der Empfindlichkeit der

Transmissionsmessung zu bekommen, wenn das Meßobjekt ohne Zwischenraum an die ATR-Platte gelegt wird. Die Verwendung einer Küvette ist damit überflüssig. Wird z.B. die ATR-Platte fest gegen die Innenlippe gepreßt, läßt sich über eine Laserlichtquelle die Glucosekonzentration in den Kapillarschlingen der Papillen messen [26]. Nach Brauner [5] können so die Lichtwellen bis ca. 20-50 μm tief eindringen. Allerdings gilt dann das Beer'sche Gesetz nicht mehr. Um die absolute Konzentration von Glucose messen zu können, dürfen die Lichtwellen eine Eindringtiefe von ca. 10 μm erreichen. Kikuchi [28] schlägt deshalb vor, bei Messungen die ATR-Platte, nach vorheriger Abtragung des Stratum corneum, an die Epidermis der Kopfhaut zu pressen. Die große Regenerationsleistung der Epidermis läßt den Abstand der ATR-Platte zu den Kapillaren rasch größer werden, so daß dieses Verfahren nur für kurzzeitige Messungen, wie z.B. den oralen Glucosetoleranztest, geeignet scheint. Die Implantation der ATR-Platte in eine Vene ist bis jetzt noch nicht möglich, da Proteinabsorptionen an den Reflexionsflächen das System schnell in eine Anisotropie bringen.

Brauner gibt deshalb dem Verfahren der Transmissionsmessung reale Erfolgsaussichten. In [5] schlägt er ein System zur Glucosebestimmung mittels IR-Absorption in Blut vor. Für in-vivo Messungen soll, statt dem in der IR-Spektroskopie üblichen Zweistrahlverfahren, ein Zweiwellenlängenverfahren Anwendung finden. Dabei wird die Absorption bei zwei verschiedenen Wellenlängen simultan bestimmt. Eine der Wellenlängen (λ_1) ist so gewählt, daß bei Konzentrationsänderung der zu untersuchenden Substanz keine oder nur eine vernachlässigbare kleine Änderung der Absorption auftritt. Die andere Wellenlänge (λ_2) legt man auf eine substanzspezifische Absorptionsbande. Durch Quotientenbildung der Absorptionswerte von λ_1 und λ_2 kann die Konzentration ermittelt werden.

1.2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Ermittlung von glucosespezifischen IR-Absorptionsbanden (auch unter in-vivo Bedingungen), die als Grundlage für die Entwicklung eines Sensors für ein implantierbares, künstliches endokrines Pankreas dienen soll. Eine solche Einheit (Abb. 1) besteht aus Insulinpumpe, Rechnungseinheit, Lichtquelle und Sensor. Hierbei wird Licht bestimmter Wellenlänge emittiert und von der Glucose absorbiert. Die absorbierte Strahlung wird vom Sensor gemessen der Rechnungseinheit zugeleitet und dort zum physiologisch richtigen Infusionssignal für die Insulinpumpe verarbeitet.

Die Lichtquelle muß monochromatische IR-Strahlung mit hoher Energiedichte aussenden, die für Konzentrationsmessungen unerlässlich ist [19]. Neben den Lasern, die sich jedoch aufgrund ihrer Größe für eine Implantation nicht eignen, wird diese Bedingung von den Halbleiterlaser/LED (Light Emitting Diode) erfüllt. Ein weiterer Vorteil der LED liegt in ihrem geringen Energieverbrauch, da die Emission der Strahlung getaktet (kurze Meßzeit - lange Auszeit) werden kann, im Gegensatz zu thermischen Strahlungsquellen mit entsprechenden Filtern. Damit erfolgt auch eine deutliche Reduktion der Wärmebelastung des Körpers.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich wie folgt:

1. In Teil I wird mit den in 3.1 beschriebenen IR-Spektrophotometern die Absorption der Glucose in wäßriger Lösung für den nahen und mittleren Infrarotbereich ($12500 - 600 \text{ cm}^{-1}$ bzw. $0.8 - 16.5 \text{ }\mu\text{m}$) untersucht. Durch den Vergleich dieses Spektrums mit dem H_2O -Spektrum werden die spezifischen Glucosebanden ermittelt. Dieser etwas umständliche Nachweis ist notwendig, da in einem implantierbaren System die Blutabsorption (80% H_2O) nicht, wie bei in-vitro-Messun-

gen mittels eines Zweistrahlverfahrens (ein zweiter, abgespalteter Meßstrahl gleicher Wellenlänge durchläuft das reine Lösungsmittel), kompensiert werden kann. In der Literatur finden sich jedoch nur Spektren von kristalliner Glucose oder von wäßrigen Glucoselösungen mit Kompensation der H_2O -Absorption.

Der Vorteil spezifischer Glucosebanden im NIR liegt im Einsatz einer Lichtquelle, die nicht gekühlt werden muß. Für Messungen im MIR ist das erforderlich, um ausreichende Schmalbandigkeit (monochromatisches Licht) zu erhalten.

2. Nach der Bestimmung der Glucosebanden schließt sich der Nachweis ihrer Existenz im Blutspektrum an, da sie von den Absorptionen der restlichen Blutsubstanzen (corpusculäre Elemente, Proteine, Lipide) verdeckt werden können.
3. Der Nachweis der Glucosebanden im Blut wird unter Konstanthaltung der übrigen Blutbestandteile erbracht. Damit kann aber eine gleichzeitige Absorption einer oder mehrerer Substanzen an einer Glucosebande nicht ausgeschlossen werden, sodaß bei Überschneidung eine empfindlichen Störung der Glucosemessung durch Konzentrationsänderung der betreffenden Substanz zu erwarten ist. Deswegen wird in Teil II das Absorptionsverhalten der übrigen Blutbestandteile untersucht und auf gemeinsame Banden mit der Glucose überprüft.

2. Grundlagen der IR-Spektroskopie

Voraussetzung bei spektroskopischen Vorgängen ist die elektromagnetische Strahlung, deren kennzeichnende Größe die Wellenlänge λ mit der Basiseinheit Meter ist. Eine zweite, für die Charakterisierung einer Wellenlängenbewegung häufig benutzte Größe, ist die Schwingungsfrequenz ν , die die Anzahl der Schwingungen pro Sekunde angibt. Speziell in der IR-Spektroskopie hat sich eine dritte Größe durchgesetzt, welche die Frequenz und auch die Wellenlänge an Bedeutung übertrifft: die Wellenzahl $\bar{\nu}$, der reziproke Wert der Wellenlänge. Sie gibt die Anzahl der Wellen an, die auf 1 cm Platz finden.

Die Strahlung breitet sich mit Lichtgeschwindigkeit ($c = 3 \cdot 10^8$ m/s) aus. Zur Erzeugung elektromagnetischer Strahlung muß Energie in irgendeiner Form aufgebracht werden. Am bekanntesten ist die Emission von Strahlung im sichtbaren Bereich durch erhitzte Materie, wie z.B. die Strahlung des weißglühenden Wolframfadens einer Glühlampe. Die elektrische Ladung ist also Energieträger, wobei die Schwingungsfrequenz der erzeugten Strahlung der freigesetzten Energie direkt proportional ist:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c \cdot \bar{\nu}$$

Die Größe h ist eine Naturkonstante, das sogenannte Planck'sche Wirkungsquantum.

Tritt die elektromagnetische Welle in Wechselwirkung mit Materie, so kann es wie bei der Strahlungserzeugung zu einem Energietransfer kommen, indem die Strahlungsenergie im molekularen System der Materie absorbiert wird. Die Strahlung der einzelnen Spektralbereiche bewirkt in der Materie - grob schematisiert - folgende Veränderungen [20]:

1. Ultraviolett und sichtbares Gebiet (10^6 - 10^4 cm^{-1}):

Die Energie der Elektronen in Atomen und Molekülen wird erhöht.

2. Infrarot (10^4 - 10^2 cm^{-1}):

Die Schwingungen der Atomkerne um ihre Ruhelagen werden angeregt und dabei Bindungslängen und Bindungswinkel verändert.

3. Mikrowellen (10^2 -1 cm^{-1}):

Die Rotationsenergie der Moleküle wird beeinflusst.

Die Schwingungen eines Moleküls werden nach verschiedenen Schwingungstypen klassifiziert, die in Tabelle I zusammengefaßt sind [15].

Streck- bzw. Deformationsschwingungen nennt man relativ einfache Bewegungen, bei denen sich nur die Bindungslängen bzw. Bindungswinkel ändern. Komplizierte Bewegungen der Moleküle, an denen mehrere Atome beteiligt sind und mehrere Bindungswinkel und Kernabstände verändert werden, heißen Nick-, Schaukel- und Torsionsschwingung. Eine solche Zuordnung bestimmter Absorptionsbanden zu genau angebbaren Bewegungen der Atome im Molekülverband (sog. "Gruppenfrequenzen") ist in der Regel gut möglich im Bereich zwischen 4000 und 1300 cm^{-1} . Bei tieferen Frequenzen können nur noch die Gruppenfrequenzen mit einiger Gewißheit identifiziert werden, deren Intensität oder Form sie aus den übrigen Banden des Gebietes heraushebt [20].

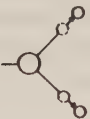
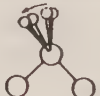
Schwingungstyp	engl. Bezeichnung	Symbol	Beispiel: Methylengruppe
Valenz- oder Streckschwingung	stretching-mode	ν_{sy}	
		ν_{asy}	
Deformations- oder Beugeschwingung	bending-mode	δ	
Nickschwingung	wagging-mode	ω	
Torsionsschwingung	twisting-mode	τ	
Schaukelschwingung	rocking-mode	ρ	

Tabelle I: Schwingungstypen eines Moleküls

Elektromagnetische Strahlung entsprechender Frequenz wird dann, aber auch nur dann, absorbiert, wenn mit der anzuregenden Schwingung der betreffenden Atomgruppe eine Dipolmomentänderung verbunden ist. Schwingungen, die keine Dipolmomentänderung induzieren können, sind durch elektromagnetische Strahlung nicht anregbar; man bezeichnet sie als IR-inaktiv [15]. Abb. 2 zeigt die Dipolmomentänderung am Beispiel der Streckschwingungen des Kohlendioxid.

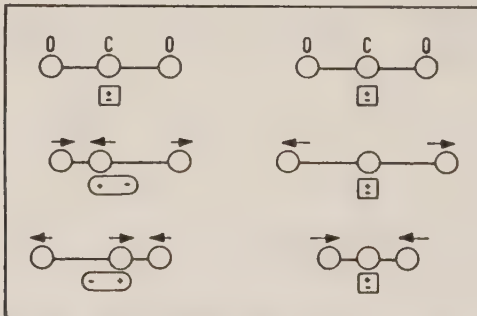


Abb. 2: Dipolmomentänderung bei Molekülschwingungen [15]

a) asymmetrische Streckschwingung

b) symmetrische Streckschwingung

Bei der asymmetrischen Streckschwingung (Abb. 2a) entfernen sich der negative Ladungsschwerpunkt der O-Atome und die positive Ladung des C-Atoms während der Schwingung voneinander. Es entsteht im Gegensatz zur Gleichgewichtslage ein Dipol. Abb. 2b zeigt eine symmetrische Streckschwingung. Die Schwerpunkte der negativen (O) und der positiven (C) Ladungen fallen in jeder Phase räumlich zusammen. Im Verlauf dieser Schwingung kann kein Dipolmoment aufkommen. Diese Schwingung ist deshalb IR-inaktiv.

Wie die Energie der Elektronen, so ist auch die Schwingungsenergie der Atome gequantelt, d.h. sie kann ganz bestimmte, durch Quantenzahlen beschreibbare Werte annehmen. Der Übergang einer zur Schwingung angeregten Atomgruppe in ein höheres Energieniveau ist nur als ein ganzzahliges Vielfaches möglich. Die Frequenz des eingestrahltten Lichtes muß genau der Energiedifferenz der beiden Energieniveaus entsprechen [6]. Diese Übergänge $\Delta v = +2, +3 \dots$ sind als Absorptionsbanden bei ungefähr der doppelten, dreifachen usw. Schwingungsfrequenz der entsprechenden Grundschiwingung ($\Delta v = 1$) zu beobachten. In Anlehnung an die entsprechende Erscheinung in der Akustik werden diese Übergänge auch Obertöne oder Oberschwingungen genannt. Ihre Intensität ist gegenüber der Grundschiwingung sehr stark vermindert, jedoch sind sie in dem Bereich des nahen Infrarot ($12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ bzw. $0,8 - 2,5 \mu\text{m}$) bei entsprechend hoher Schichtdicke gut zu beobachten. Die Rückkehr in den nächst niedrigen Energiezustand bzw. in den Grundzustand erfolgt unter Strahlungsemission oder strahlungslos durch Energieabgabe an die Umgebung.

Trägt man über einen möglichst großen Frequenzbereich des Infraroten die Absorption einer Substanz gegen die Frequenz auf, so erhält man aus der Lage der Maxima, der Intensität, der Breite und der Form der Absorptionsbanden einen Überblick über das Schwingungsspektrum der Substanz. Anhand einer solchen Spektrenkarte ist ein Molekül eindeutig identifizierbar. Ferner kann eine der Absorptionsbanden zu quantitativen Messungen herangezogen werden.

3. Material und Methode

3.1 IR-Spektrophotometer

Die Spektren des mittleren Infrarotbereiches ($4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$, bzw. $2,5 - 16,5 \text{ }\mu\text{m}$) wurden mit dem Doppelstrahlspektrophotometer PE 580 der Firma Perkin-Elmer aufgenommen.

Die Doppelstrahltechnik gestattet es, die Durchlässigkeit direkt zu messen. Mit Hilfe einer Spiegeloptik wird die erzeugte Strahlung in zwei Strahlenbündel zerlegt und getrennt dem Probenraum zugeführt. Während ein Strahlenbündel durch die Probe geht (Meßstrahl), passiert das andere ungehindert den Probenraum (Vergleichsstrahl) und zeigt der Verrechnungseinheit die Intensität der Primärstrahlung I_0 an. Diese Technik trägt der Tatsache Rechnung, daß die Intensität der erzeugten Primärstrahlung nicht konstant, sondern eine Funktion der Wellenlänge ist. Darüber hinaus ist man auch in der Lage, unerwünschte Einflüsse wie Absorptionen von Fenstermaterial und Lösungsmittel zu kompensieren, indem eine mit reinem Lösungsmittel gefüllte Küvette mit Küvettenfenster aus gleichem Material und Dicke in den Vergleichsstrahl gebracht wird.

Insgesamt vier Beugungsgitter ermöglichen Spektrenaufzeichnungen in einem Bereich von $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ ($2,5 - 50 \text{ }\mu\text{m}$).

Die Öffnung von Ein- und Austrittsspalt wird elektronisch so geregelt, daß am Detektor über den gesamten Wellenzahlbereich hinweg etwa dieselbe Strahlungsleistung ankommt. Die Wahl des Spaltprogrammes bestimmt das Auflösungsvermögen. Nahezu alle Spektren wurden mit dem Spaltprogramm 5 aufgezeichnet, das ein gutes Auflösungsvermögen von $1,3 \text{ cm}^{-1}$ bei geringem Rauschpegel zuläßt.

Durch Aufzeichnung des Spektrums eines Wellenzahlstandards erfolgte die Prüfung der Wellenzahlanzeige auf Richtigkeit. Die Bandenlagen wurden auf Übereinstimmung untersucht. Als Wellenzahlstandard diente eine von der Herstellerfirma beigelegte Karte mit einer Polystyrolfolie.

Das Doppelstrahlspektrometer DK-2 der Fa. Beckman Instruments ermöglichte die Aufnahme der Spektren im nahen Infrarotbereich ($12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ oder $0,8 - 2,5 \mu\text{m}$).

3.2 Küvetten

Für die Messungen ist eine zerlegbare Flüssigkeitsküvette mit jeweils 2 mm dicken ZnSe-Fenstern verwendet worden. Sie zeichnen sich durch große Härte und Unempfindlichkeit gegenüber wässrigen Lösungen (Blut), Säuren und Basen aus. Ferner sind sie bis 500 cm^{-1} durchlässig und decken den für die Meßbereich bis 600 cm^{-1} gut ab. Wie Abb. 3 zeigt, beginnt die Eigenabsorption der Fenster erst ab 600 cm^{-1} , ehe sie nach 460 cm^{-1} keine Strahlung mehr durchlassen. Eine Kompensation der ZnSe-Fenster ist durch das Fehlen von Absorptionsbanden somit nicht erforderlich.

Bei Verwendung von Fenstermaterial, das wie ZnSe einen hohen Brechungsindex hat, kann man bei wassergefüllten Küvetten Interferenzen in den Spektralbereichen mit einem geringen Absorptionskoeffizienten beobachten [10]. Will man diese Interferenzen beseitigen, ist es notwendig, die ZnSe-Fenster gegen ein Material mit einem niedrigeren Brechungsindex auszutauschen. Als Alternative bieten sich BaF_2 -Fenster an, deren Durchlässigkeitsgrenze sich bei 850 cm^{-1} befindet. Ihr Nachteil liegt in der Säure-Empfindlichkeit und in der Niederschlags-

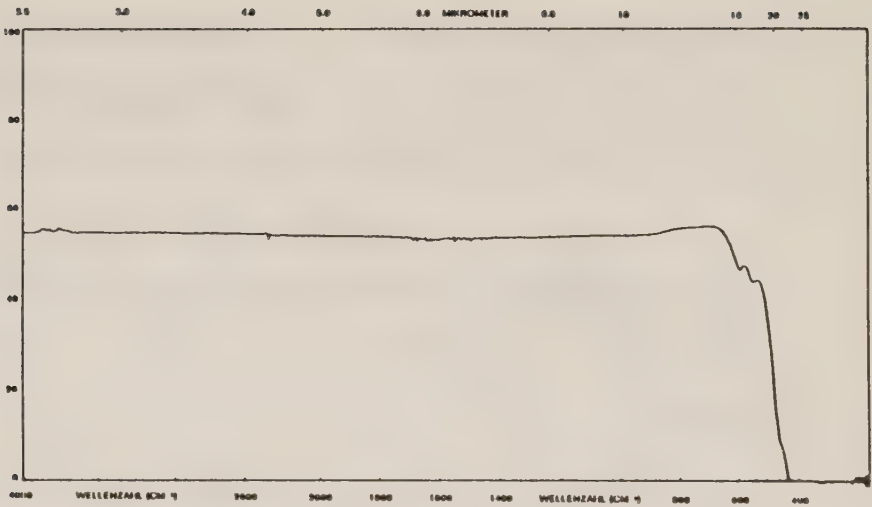


Abb. 3: Absorptionsspektrum der ZnSe-Küvette

bildung mit Phosphat- und Sulfationen. In Arbeiten, die das gesamte MIR abdecken müssen, findet man noch eine andere Variante. Bis 1100 cm^{-1} werden die robusten CaF_2 -Fenster verwendet, ehe man sie dann durch KRS-5 Fenster (Mischkristall aus 42% Thalliumbromid und 58% Thalliumiodid) ersetzt.

Den Anforderungen genügen daher am ehesten Fenster aus ZnSe-Material, die auch bei den Messungen von Kaiser und Kikuchi Verwendung fanden. Den Nachteil der Interferenzbildung muß man dabei in Kauf nehmen, die aber auf die Absorptionsbanden in dem Bereich von $1650 - 600\text{ cm}^{-1}$ keinen Einfluß hat.

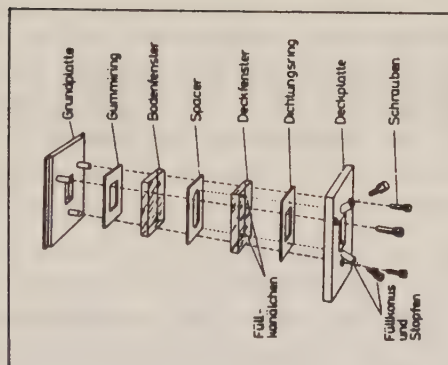


Abb. 4: Aufbau einer abgedichteten Flüssigkeitsküvette [20]

Die Aufzeichnung der Spektren im mittleren Infrarot-Bereich (MIR) geschah mit einer Schichtdicke von $25\text{ }\mu\text{m}$, während die größere Energie der kürzerwelligen Strahlung zweimal einen Schichtdickenwechsel im nahen Infrarot-Bereich (NIR) erforderlich machte. Die Spektrenaufnahme im Bereich von $7150 - 4000\text{ cm}^{-1}$ ($1,4 - 2,5\text{ }\mu\text{m}$) entstanden bei einer Schichtdicke von $200\text{ }\mu\text{m}$. Die Absorptionsmessungen in dem Spektralbereich von $12500 - 7150\text{ cm}^{-1}$ ($0,8 - 1,4\text{ }\mu\text{m}$) wurde bei einer Schichtdicke von 1 cm vorgenommen. Dabei mußte aus technischen Gründen - eine Schichtdicke von 1 cm ist mit der in Abb. 4 gezeigten Küvette nicht möglich - die ZnSe-Küvette gegen eine konventionelle Glasküvette entsprechender Schichtdicke ausgewechselt werden.

Die Reinigung der Küvette geschah mit Aceton, das Ausblasen der Flüssigkeitsreste mit Druckluft. Vor jeder Messung fand eine Kontrolle der Küvette auf Fremdbanden statt.

3.3 Meßmethoden

Als Ordinatenmaßstab wurde ausschließlich die in Prozent angegebene Durchlässigkeit (nach oben ansteigend) benutzt. Der Wellenzahl-lineare Abszissenmaßstab weist eine, in der IR-Spektroskopie übliche, Besonderheit auf. Ein Maßstabwechsel im Verhältnis 2:1 bei 2000 cm^{-1} verhindert, daß der relativ unspezifische und bandenarme Bereich zwischen 4000 und 2000 cm^{-1} mehr als die Hälfte der Skala einnimmt.

Die Aufnahme aller Spektren erfolgte ohne Kompensation des Lösungsmittels. Das hat die Überlagerung der Absorptionsbanden der gelösten Substanz durch die sehr hohe Eigenabsorption des Wassers zur Folge. Dies berücksichtigt jedoch die besonderen Bedingungen der in-vivo-Messung des Blutzuckers. Die Kompensation der H_2O -Absorption mit einem Vergleichsstrahl ist hier nicht, wie bei in-vitro-Messungen, durch das Einbringen einer mit Wasser gefüllten Küvette möglich. Somit ist das von Brauner und Müller [5] vorgeschlagene Zweiwellenlängenverfahren erforderlich (s. S.4).

Die gewonnenen Spektren wurden mit der in den entsprechenden Kapiteln angegebenen Literatur auf Übereinstimmung verglichen.

TEIL I: ABSORPTION VON GLUCOSE

1. Die Absorptionsspektren von H_2O , Glucose und Blut im mittleren Infrarot-Bereich (MIR)

1.1 Einleitung

In diesem Teil der Arbeit wird der Bereich von $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ auf Absorptionen der Glucose in wässriger Lösung untersucht. Ein solches Spektrum enthält neben den Glucosebanden die Absorptionen des Lösungsmittels Wasser, welche eine Zuordnung der Banden ohne Kenntnis der spektralen Eigenschaften des H_2O -Moleküls unmöglich machen. Deshalb wird zuerst das Spektrum von bi-distilliertem Wasser vorgestellt und besprochen. Es folgt ein Vergleich der Spektren von Wasser und Glucoselösung. Neu auftretende Banden weisen somit eindeutig auf Absorptionen des Glucosemoleküls hin. Ihre Ursachen werden diskutiert und den Schwingungen der einzelnen Atomgruppen zugeordnet.

Eine Aufzeichnung des Absorptionsverhaltens von frischem Blut und dessen Vergleich mit dem H_2O -Spektrum schließen sich an. Die blutspezifischen Absorptionsbanden werden dabei mit den Glucosebanden auf Übereinstimmung untersucht. Eine Zuordnung der Banden geschieht an dieser Stelle noch nicht, da ein so heterogenes Gemisch viele Ursachen vermuten läßt. Eine Bestimmung erfolgt erst nach Kenntnis des spektralen Verhaltens der verschiedenen Blutbestandteile.

1.2 Experimentelle Bedingungen

Eine 2-molare Glucoselösung wurde mit D(+)-Glucose der Firma Merck hergestellt. Für die Spektrenaufnahme wurde antikoaguliertes Blut unverdünnt in eine ZnSe-Küvette mit $25 \text{ }\mu\text{m}$ Schichtdicke gefüllt. Um eventuelle Störungen des Absorptionsspektrums durch das Antikoagulans auszuschließen, wurde Blut desselben Patienten jeweils mit den Anti-

koagulantien NaF, EDTA und Heparin abgenommen, aufgezeichnet und auf Übereinstimmung verglichen (Abb. 12). Dabei ließen sich Störungen durch Absorptionsbanden der Antikoagulantien nicht nachweisen.

1.3 Meßergebnisse und Diskussion

1.3.1 H₂O

Für die Entstehung des Lebens und praktisch für alle biologisch-chemischen Prozesse ist Wasser von elementarer Bedeutung. So besteht der menschliche Organismus zu 60% [34] aus Wasser. Diese überragende Stellung verdankt das Wasser seinen besonderen physikalisch-chemischen Eigenschaften. An erster Stelle ist die Polarität des Wassers zu nennen. Sie kommt durch die Anziehungskraft des elektronegativen Sauerstoffatoms zustande, welche auf die Elektronen beider Wasserstoffatome wirkt und damit den negativen Pol eines Dipols bildet. Diese Dipoleigenschaft bewirkt in der IR-Spektroskopie besonders intensive Absorptionen, die Brügel einmal veranlaßten, das Wasser als den "Todfeind der IR-Spektroskopie" zu bezeichnen [7]. Tatsächlich zeigt das Spektrum über den gesamten Bereich eine hohe Absorption, in dem drei äußerst starke und breite Banden um 3400, 1650 und 800 cm⁻¹ dominieren (Abb. 5).

Die Intensität der Absorption zwischen 3700 und 3000 cm⁻¹ ist so groß, daß das Maximum erst bei kleinerer Schichtdicke oder einer höheren Leistung des Strahlenbündels zu bestimmen ist. Bei einer Schichtdicke von <10 µm wies Robertson [42] das Maximum bei 3400 cm⁻¹ nach. Die Absorption wird von den symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen der OH-Gruppe verursacht [43], die aber nur im gasförmigen Zustand als getrennte Absorptionsbanden zu beobachten sind.

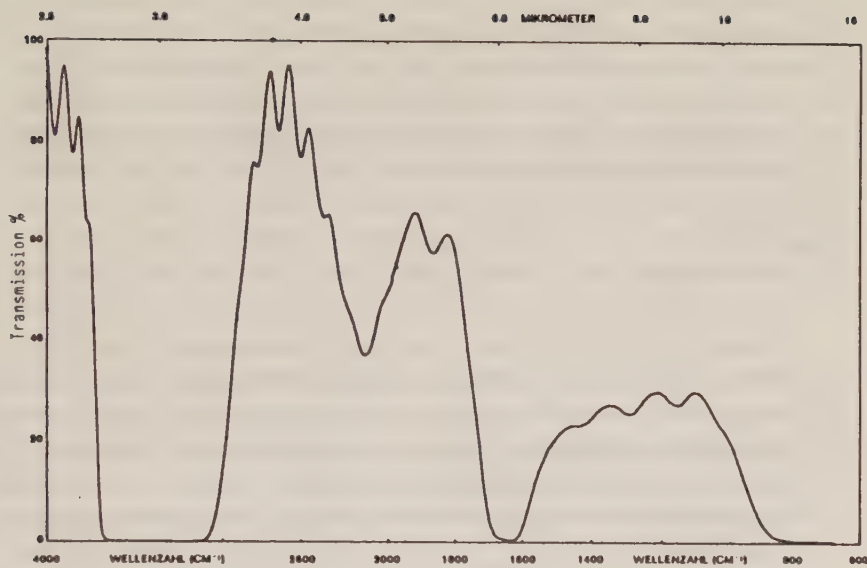


Abb. 5: Absorptionsspektrum von H₂O

Wall et al. [54] ermittelten die intermolekularen H-Brückenbindungen als Ursache der Absorptionsbreite, indem ein H-Atom gegen sein Isotop Deuterium ausgetauscht wurde. Mit der Abnahme der Polarität verringerte sich auch die Anzahl der H-Brücken. Die Breite und die Intensität der Bande verringert sich daraufhin. In diesem Bereich (3300 cm^{-1}) liegt auch der 1. Oberton der $\delta(\text{OH})$ -Beugeschwingung, welche die intensive Absorptionsbande bei 1650 cm^{-1} hervorruft [36].

Eine weitere intensive Absorption mit einem Maximum bei 680 cm^{-1} [43] wird von der Librationsschwingung des H₂O-Moleküls ausgelöst. Das Molekül dreht sich hierbei um seine eigene Gleichgewichtslage.

Die Absorptionsbande bei 2120 cm^{-1} geht aus einer Kombination der Beuge- und Librationsschwingung hervor [43].

Die Peaks bei 2500 und 1900 cm^{-1} beruhen wie auch die im Bereich von $1650 - 800\text{ cm}^{-1}$ auf Interferenzerscheinungen, deren Ursache in Kapitel 3.3.2 besprochen wurde.

1.3.2 Glucose

Glucose ist ein einfacher Zucker, ein Monosaccharid, mit sechs C-Atomen, der sich von einem 6-wertigen Alkohol durch Oxidation am C_1 -Atom ableiten läßt. Die dabei entstehende Aldehyd-Gruppe liegt aber zum größten Teil nicht in freier Form vor, sondern reagiert mit der alkoholischen Gruppe am C_5 -Atom desselben Moleküls zu einem zyklischen Halbacetal. Glucose mit diesem Aufbau wird als D-Glucopyranose bezeichnet.

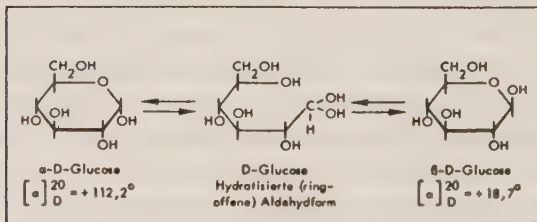


Abb. 6: Gleichgewicht der α -D-Glucose und β -D-Glucose in wässriger Lösung [8]

Zugleich tritt an die Stelle der ursprünglichen Aldehydgruppe ein neues asymmetrisches C-Atom, das zwei verschiedene räumliche Anordnungen der Hydroxylgruppe und des Wasserstoffs ermöglicht: α - und β -Form der Glucose (s. Abb. 6). Man kann die α - und β -Konfiguration der Glucose nur im kristallinen Zustand angeben. In Lösung bildet sich ein Gleichgewicht beider Formen aus, wobei die β -D-Glucose mit 62% gegenüber der α -D-Glucose mit 38% überwiegt. Da bei diesem Vorgang die Ebene des polarisierten Lichtes gedreht wird, nennt man diese Erscheinung Mutarotation.

Eine weitere Eigenschaft von Glucose, die auf das spektrale Verhalten einen Einfluß hat, wird ermöglicht durch die freie Drehbarkeit der C-C, bzw. C-O-Bindung. Dadurch kann das Glucosemolekül die in Abb. 7 gezeigten räumlichen Anordnungen einnehmen. Die stabilere und energieärmere Sesselform und die Bootsform, zu deren Überführung eine Energie von 25 J/mol notwendig ist.

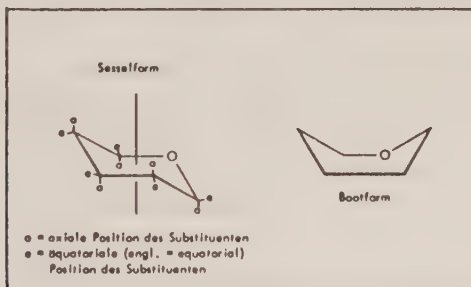


Abb. 7: Die Konformationen des Pyranringes [8]

Die Sesselform selbst kann wieder in zwei ineinander überführbare Alternativen vorliegen, die sich in der Anordnung der OH-Gruppen in

äquatorialer oder axialer Position unterscheiden. Die bevorzugte Form ist die äquatoriale Anordnung, da hier die Repulsionseffekte der OH-Gruppen untereinander am geringsten sind.

Das Glucosespektrum in Abb. 8 weist gegenüber H_2O bis 1650 cm^{-1} nahezu keinen Unterschied auf. Nur bei 2980 cm^{-1} gibt es eine leichte Schulter mit einem flacheren Rückgang der Transmissionskurve. Das Spektrum von fester Glucose [47] zeigt eine mittelstarke Absorption mit zwei Banden bei 2950 und 2900 cm^{-1} . Sie sind der $\nu_{\text{asy}}(\text{CH}_2)$ - und $\nu_{\text{sy}}(\text{CH}_2)$ -Schwingung zuzuordnen [51]. Die $\nu_{\text{asy}}(\text{OH})$ - und $\nu_{\text{sy}}(\text{OH})$ -

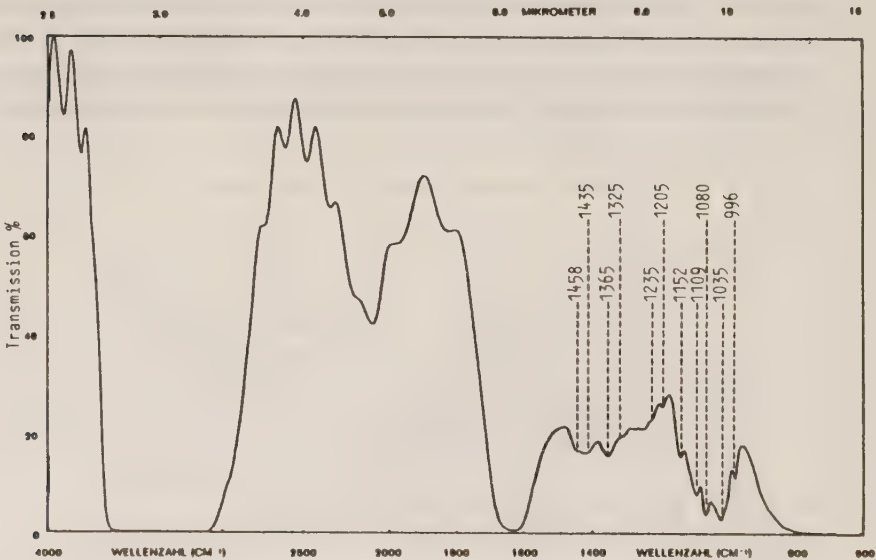


Abb. 8: Absorptionsspektrum einer 2-molaren Glucoselösung

Schwingungen können in fester Form bei 3410 und 3320 cm^{-1} als getrennte Absorptionsbanden gesehen werden. Beide Schwingungen fallen in den intensiven Absorptionsbereich der $\nu(\text{OH})$ -Schwingung des Wassers und entziehen sich dadurch der weiteren Beobachtung. Die Banden bei 2120 und 1650 cm^{-1} werden von Schwingungen des Lösungsmittels hervorgerufen.

Die $\delta(\text{OH})$ -Schwingung des Glucosemoleküls gibt eine unscharfe Absorption in dem Bereich von $1450 - 1200\text{ cm}^{-1}$ [1], die von anderen Gruppenschwingungen überlagert wird. Die Ursache ist in der Bildung von intermolekularen H-Brücken nach dem Schema $\text{R-O-H} \cdots \text{O-R}$ zu sehen, wobei eine Dehnung der R-OH-Bindung und dadurch eine stärkere Polarisierung stattfindet. Die Erhöhung der Bindungspolarisierung bewirkt eine größere Änderung des Dipolmoments während des Schwingungsvorgangs. Damit nimmt die Extinktion an Höhe und Breite zu. Eine scharfe, ungestörte Absorption der $\delta(\text{OH})$ -Schwingung ist also nur in unpolaren Lösungsmitteln bei geringer Konzentration zu sehen [18].

In einer breiten Absorption mit einem Maximum bei 1435 cm^{-1} ist eine zweite Absorption bei 1458 cm^{-1} integriert. Während die letztere auf die $\delta(\text{CH}_2)$ -Schwingung zurückzuführen ist, wird die 1435 cm^{-1} -Bande von der Beugeschwingung der CH-Gruppe verursacht [23]. Abb. 9 zeigt die Bewegungen der H-Atome im Molekülverband.

Komplexe Schwingungen der CH_2OH -Gruppe bewirken die Absorptionsbanden in dem Gebiet von $1365-1220\text{ cm}^{-1}$. Die Bande bei 1365 cm^{-1} ist der Nickschwingung $\omega(\text{CH}_2)$ zugeordnet [11]. Neben den drei Atomen H-C-H ist noch ein Sauerstoff- oder ein Kohlenstoffatom an der Schwingung beteiligt. Mathlouthi [35] trägt der Isomerie des Moleküls Rechnung. Er ordnet die Absorption bei 1365 cm^{-1} der $\omega(\text{CH}_2)$ -Schwingung der β -Glucose und die 1325 cm^{-1} -Bande der α -Glucose zu. Die Torsionsschwingung $\tau(\text{CH}_2)$ wird allgemein bei 1235 cm^{-1} erwartet und erscheint als Schulter.

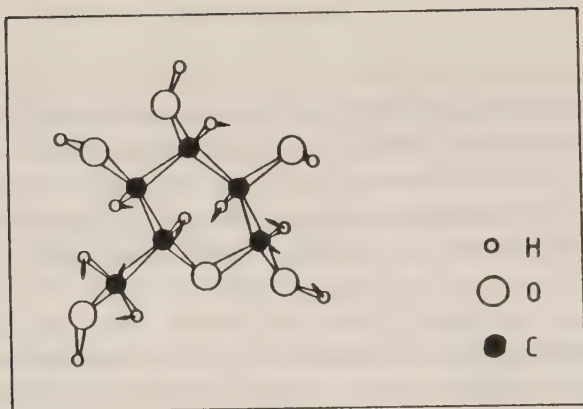


Abb. 9: $\delta(\text{CH})$ -Schwingung der Glucose bei 1435 cm^{-1} nach Cael et al. [11]

Die Bande bei 1205 cm^{-1} ist nicht eindeutig identifizierbar. Berechnungen von Hineno [23] und Vasko [53] zufolge sind $\nu(\text{C-C})$ und $\delta(\text{C-C-H})$ -Schwingungen in Betracht zu ziehen.

Über den Bereich von $1180\text{-}990\text{ cm}^{-1}$ erstreckt sich eine breite, äußerst intensive Absorption, die in erster Linie von der $\nu(\text{CO})$ -Schwingung hervorgerufen wird. Durch die Absorptionen in diesem Gebiet und die kräftige OH-Bande bei 3320 cm^{-1} sind die Alkohole sicher zu identifizieren [18]. Die Zuordnung der Banden zur jeweiligen Schwingung ist jedoch infolge von Kopplungseffekten der $\nu(\text{CO})$ -mit der $\delta(\text{OH})$ -Schwingung schwierig [6].

Die meisten Spektren von Ringzuckern haben eine Absorptionsbande bei 1152 cm^{-1} . Dies veranlaßten Cael et al. [11] zu der Annahme einer "Ringschwingung", die von den $\nu(\text{CO})$ -, $\delta(\text{OH})$ - und $\nu(\text{C-C})$ -Schwingungen hervorgerufen wird. Abb. 10 zeigt die Bewegung der einzelnen Atome, die das gesamte Molekül ins Schwingen bringen.

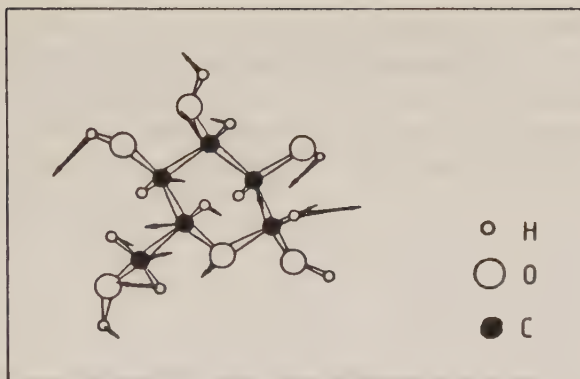


Abb. 10: "Ringschwingung" der Glucose bei 1152 cm^{-1} nach Cael et al. [11]

Als ein weiteres Indiz machen sie geltend, daß die "Ringschwingung" der beiden Isomere keinen Frequenzunterschied aufweist. Ursache der etwas intensiveren Bande bei 1109 cm^{-1} ist Hineno [23] und Mathlouthi [35] zufolge die Streckschwingung des endocyclischen Sauerstoffs $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$.

Die größte Intensität in diesem Absorptionsbereich zeigen die Banden bei 1080 und 1035 cm^{-1} . Sie entstehen durch die $\nu(\text{CO})$ -Schwingung, wobei die 1080 cm^{-1} -Absorption der β -Glucose und die bei 1035 cm^{-1} der α -Glucose zugeschrieben wird [1, 35]. Die Schultern bei 1060 und 1015 cm^{-1} beruhen möglicherweise auf einer $\nu(\text{CO})$ -Schwingung der axialen Konformation der beiden Glucosemoleküle [21]. Die Schaukelschwingung $\rho(\text{CH}_2)$ gilt als Auslöser der Bande bei 996 cm^{-1} [53]. Die sich anschließende Librationsschwingung des Wassers verdeckt weitere Absorptionen.

Die Zuordnung der Banden in dem Bereich von $1200 - 950 \text{ cm}^{-1}$ ist nicht einheitlich. Die Brauchbarkeit einer Absorptionsbande zu quantitativen Messungen wird jedoch durch eine unklare Bestimmung sicherlich nicht gemindert, solange bewiesen werden kann, daß diese Bande allein durch eine Schwingung von Atomgruppen des Glucosemoleküls erzeugt wird.

1.3.3 Blut

Blut ist ein flüssiges Gewebe, das aus corpusculären Elementen - den roten (Erythrocyten) und weißen (Leukocyten) Blutkörperchen und den Blutplättchen (Thrombozyten) - besteht, die in einem wäßrigen Medium, dem Plasma, suspendiert sind. Der Anteil des Wassers am Blut beträgt ca. 80 %, am Plasma ca. 91 %. So ist es nicht überraschend, wenn das Spektrum des Blutes bis 1650 cm^{-1} eindeutig von dem Absorptionsverhalten des Wassers bestimmt wird (Abb. 11).

In das Gebiet der $\nu(\text{OH})$ -Schwingung fallen die $\nu(\text{NH}, \text{NH}_2, \text{NH}_3^+)$ -Schwingungen der Aminosäuren. Sie sind, wie auch die $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung bei 1700 cm^{-1} , von der Absorption des Wassers verdeckt [16]. Die $\nu(\text{CH}, \text{CH}_2, \text{CH}_3)$ -Schwingungen können an der leichten Schulter bei 2980 cm^{-1} und an dem langsameren Transmissionsrückgang um 2850 cm^{-1} beobachtet werden, der jedoch gegenüber der Glucose keinen Unterschied erkennen läßt.

Das Spektrum zeigt aber eine Besonderheit. Im Bereich von $4000 - 3800 \text{ cm}^{-1}$ läßt sich eine Transmissionsminderung feststellen, die sich in Abhängigkeit des Antikoagulans ändert (Abb. 12). Dabei nimmt die Durchlässigkeit von Heparin- über EDTA- nach NaF-Blut ab. Weitere Störungen des Spektrums durch Absorption der Antikoagulantien sind, insbesondere in dem Bereich von $1650 - 600 \text{ cm}^{-1}$, nicht nachzuweisen.

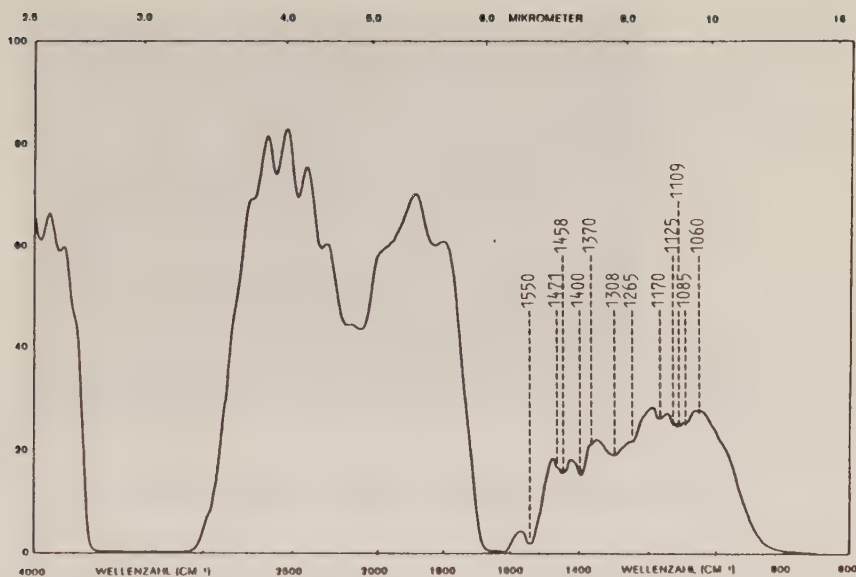


Abb. 11: Absorptionsspektrum von NaF-Blut

Spezifische Absorptionsbanden existieren nur im Bereich von $1650 - 800 \text{ cm}^{-1}$, die alle in dem Spektrum von Citratblut ihre Bestätigung finden, das von Kaiser in [27] vorgestellt wird. Eine Zuordnung der Banden soll erst nach Kenntnis des Absorptionsverhaltens der Bluts-substanzen vorgenommen werden. Das Gebiet weist gegenüber der Glucoseabsorption einige Veränderungen auf. So fehlen die intensiven Absorptionsbanden bei $1550, 1400, 1308, 1170$ und 1125 cm^{-1} im Glucosespektrum. Die Absorptionen bei $1458, 1109$ und 1085 cm^{-1} finden sich in beiden Spektren wieder. Dem Plateau bei 1060 cm^{-1} schließt sich eine kleine Schulter bei 995 cm^{-1} an, ehe die Librationsschwingungen der H_2O -Moleküle keine Absorptionsbanden mehr zulassen.

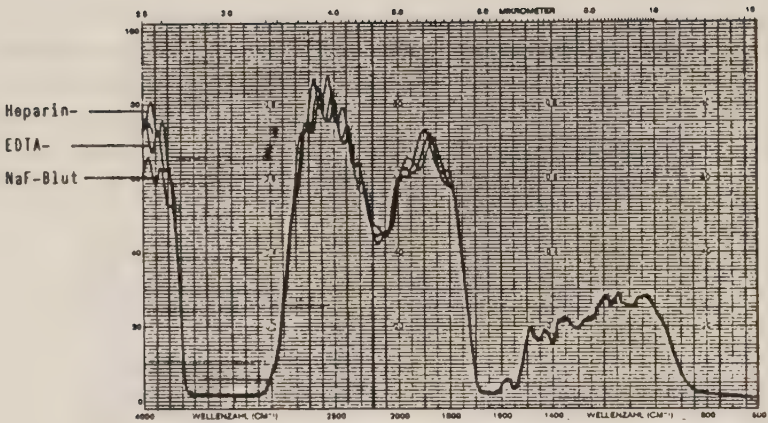


Abb. 12: Absorptionsspektren von Heparin-, EDTA- und NaF-Blut

2. Die Absorptionsspektren von H₂O, Glucose und Blut im nahen Infrarot (NIR)

2.1 Einleitung

Das nahe Infrarot schließt sich dem sichtbaren Gebiet bei 0,8 μm (12500 cm^{-1}) an und endet bei 2,5 μm (4000 cm^{-1}). Im allgemeinen findet der kürzerwellige Bereich in der IR-Spektroskopie keine große Beachtung.

Neben den Obertönen können noch Schwingungen beobachtet werden, die aus Kombinationen des ein- oder mehrfachen Frequenzbetrages von zwei oder mehr Grundschwingungen hervorgehen. Als Folge der Inharmonizität der Schwingung liegen die Obertöne und Kombinationsschwingungen nicht

genau bei der zu errechnenden Wellenzahl. Ihre Intensität ist gegenüber den Grundschrwingungen sehr stark vermindert, so daß nur wenige Banden bei entsprechender Schichtdicke zu sehen sind [13].

2.2 Experimentelle Bedingungen

Die höhere Energie der kürzerwelligen Strahlung erfordert Küvetten mit größerer Schichtdicke. Bei einer Schichtdicke von 200 μm ließen sich die Absorptionsbanden in dem Bereich von 2,5 - 1,3 μm gut darstellen. Weitere Absorptionen erhielt man erst nach Austausch der ZnSe-Küvette gegen eine Glasküvette mit 10 mm Schichtdicke. Neben einer 2-molaren Glucoselösung wurde auch das Spektrum von NaF-Blut aufgenommen und mit dem H_2O -Spektrum verglichen.

Als Ordinatenmaßstab dient die in Prozenten angegebene, nach oben ansteigende Durchlässigkeit. Die Abszisse wird von dem Spektrophotometer in Wellenlängen eingeteilt, von links nach rechts linear ansteigend. In Anlehnung an die in der MIR übliche Einteilung geschieht die Angabe der Wellenzahl am oberen Bildrand der Spektren.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 H_2O

Die Absorptionsbanden im NIR setzen sich aus den drei Grundschrwingungen $\nu_{\text{asy}}(\text{OH})$, $\nu_{\text{sy}}(\text{OH})$ und $\delta(\text{OH})$ zusammen. Die Durchlässigkeit nimmt in Richtung des sichtbaren Spektralbereichs kontinuierlich zu (Abb. 13).

Eine erste breite und sehr intensive Bande liegt bei $1,91 \mu\text{m}$ (5236 cm^{-1}). Sie geht aus einer Kombination der $\nu_{\text{asy}}(\text{OH})$ und der $\delta(\text{OH})$ -Schwingung hervor [9]. Die Addition beider Grundschwingungen ergibt:

$$3625 \text{ cm}^{-1} [\nu_{\text{asy}}(\text{OH})] + 1650 \text{ cm}^{-1} [\delta(\text{OH})] = 5275 \text{ cm}^{-1}$$

Der Wert stimmt mit der experimentell ermittelten Absorptionsbande gut überein.

Der Bande schließt sich eine schwache Schulter bei $1,73 \mu\text{m}$ (5780 cm^{-1}) an. Neben der $\nu_{\text{asy}}(\text{OH})$ - und der $\delta(\text{OH})$ -Schwingung hält Yamatera [56] eine Beteiligung der Librationsschwingung am Zustandekommen der Absorption für wahrscheinlich. Der Schulter folgt eine breite Absorptionsbande, deren Intensität gegenüber der ersten geringer ist. Die Bande liegt bei $1,42 \mu\text{m}$ (7042 cm^{-1}) und geht aus einer Kombination der $\nu_{\text{asy}}(\text{OH})$ - und $\nu_{\text{sy}}(\text{OH})$ -Schwingung hervor [56].

Die Fortsetzung des Spektrums zeigt Abb. 14. Die relativ schwache Absorptionsbande bei $1,16 \mu\text{m}$ (8621 cm^{-1}) führt man auf eine Kombination der drei Grundschwingungen zurück [40]. Der deutliche und rasche Rückgang der Extinktion wird von einer mittelstarken Absorption bei $0,95 \mu\text{m}$ (10526 cm^{-1}) unterbrochen. Paquette [40] ordnet diese Bande der Kombination der zweifachen $\nu_{\text{asy}}(\text{OH})$ - und der $\nu_{\text{sy}}(\text{OH})$ -Schwingung zu.

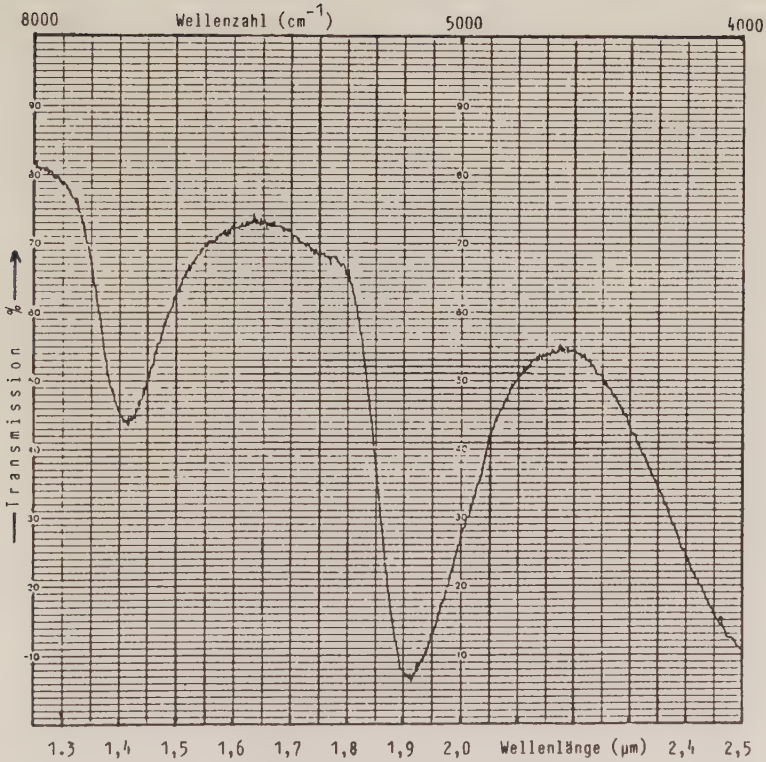


Abb. 13: Absorptionsspektrum von H₂O bei 200 µm Schichtdicke

2.3.2 Glucose

Abb. 14 und 15 zeigen das Spektrum einer 2-molaren Glucoselösung. Während die Bande bei 1,41 µm sowohl an Lage, Breite und Tiefe mit der H₂O-Absorption übereinstimmt, ist die Extinktion der 1,91 µm-

Bande geringfügig höher. Die Breite bleibt unverändert. Hierbei wird die Kombinationsschwingung des H_2O -Moleküls durch die gemeinsame $\nu_{\text{asy}}(\text{OH})$ - und $\delta(\text{OH})$ -Schwingung der Glucose verstärkt.

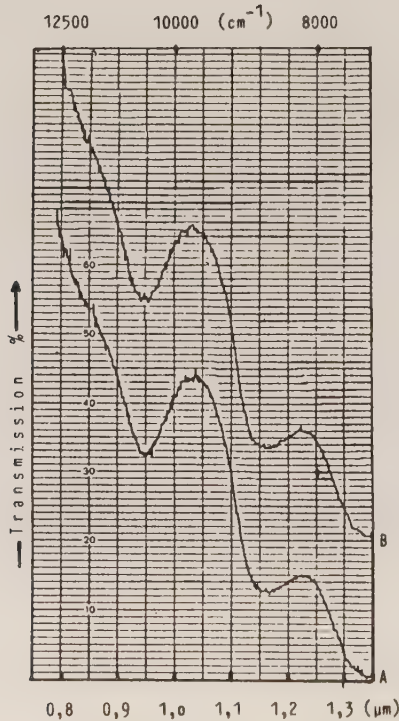


Abb. 14: Absorptionsspektren von H_2O (A) und einer 2-molaren Glucose-lösung (B) bei einer Schichtdicke von 10 mm

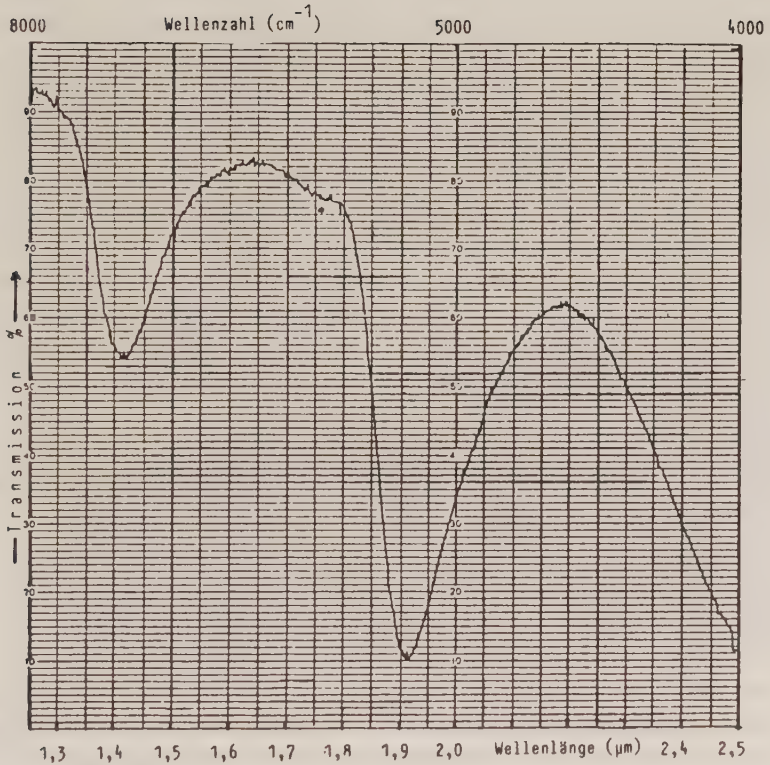


Abb. 15: Absorptionsspektrum einer 2-molaren Glucoselösung (Schichtdicke 200 μm)

Auch der Spektralbereich von 0,8 - 1,35 μm (Abb. 14 B) läßt keine glucosespezifischen Absorptionsbanden erkennen. Beide Spektren sind nahezu identisch.

Neben den Schwingungen der OH-Gruppen vermögen auch die Schwingungen der Methin (CH)- und Methylengruppe (CH₂) Absorptionsbanden hervorzurufen. Den 1. Oberton der $\nu(\text{CH}, \text{CH}_2)$ -Schwingung erwartet man bei ca. 1,71 μm . Da die Schulter, die bei dieser Wellenlänge auftritt, gegenüber der H₂O-Absorption bezüglich Lage, Form und Intensität keinen Unterschied zeigt, kann eine Absorption des 1. Obertons nicht bestätigt werden. Der 2. Oberton bei ca. 1,2 μm (8333 cm^{-1}) wie auch die Kombination der $\nu(\text{CH}, \text{CH}_2)$ und $\delta(\text{CH}, \text{CH}_2)$ -Schwingung bei 2,3 μm (4348 cm^{-1}) können keine Veränderung des Spektrums hervorrufen. Ressler und Ziauddin [41] fanden heraus, daß die Absorptionsbanden der CH-Schwingungen schon bei geringer Anwesenheit von H₂O nicht mehr zu beobachten sind. Außerdem sind die CH-Schwingungen nicht glucosespezifisch genug, um sie über Kompensation der H₂O-Absorption der quantitativen Messung zugänglich zu machen.

Die ersten zwei Obertöne der intensiven $\nu(\text{CO})$ -Schwingung liegen noch im MIR. Eine Bande von ausreichender Intensität kann im NIR daher nicht mehr erwartet werden.

2.3.3 Blut

Das Spektrum von NaF-Blut hat über den gesamten Bereich eine gleichmäßig geringere Durchlässigkeit mit zwei Absorptionsbanden, deren Maxima sich bei 1,91 und 1,42 μm befinden. Ihre Lage stimmt mit den H₂O- und Glucosebanden überein. Sie können daher der entsprechenden Kombination der OH-Grundschrwingungen zugeordnet werden.

Die Form der Banden weist allerdings eine Besonderheit auf. Die zu größeren Wellenlängen liegenden Schenkel der Absorptionsbanden steigen langsamer an. In die Absorption der 1,91 μm -Bande fällt eine

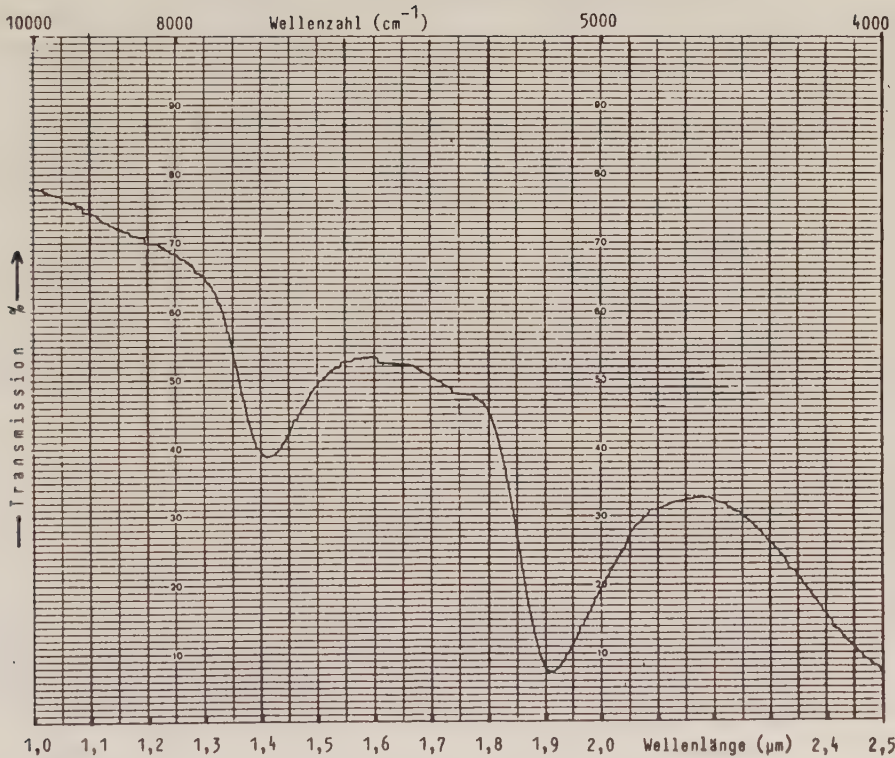


Abb. 16: Absorptionsspektrum von Blut (Schichtdicke 200 μm)

Kombination der $\nu(\text{NH}, \text{NH}_2)$ - und $\delta(\text{NH}, \text{NH}_2)$ -Schwingung, deren Maximum Vandermeulen [52] bei 2,05 μm (4878 cm⁻¹) nachwies. Sie trägt wie auch die Bande des 1. Obertons der $\nu(\text{NH}, \text{NH}_2)$ -Schwingung die bei 1,52 μm liegt [52], zur Verbreiterung der Absorptionsbanden (1,91 bzw. 1,42 μm) bei.

Weitere Veränderungen sind nicht feststellbar.

3. Qualitativer Nachweis der Glucoseabsorption in Blut

3.1 Einleitung

In den vorangegangenen Kapiteln wurde der Bereich von $12500\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ auf Absorptionsbanden von Glucose in wäßriger Lösung untersucht. Dabei waren Absorptionen nur in einem Bereich von $1650 - 900\text{ cm}^{-1}$ nachweisbar. Dieser Bereich trägt in der IR-Spektroskopie auch die Bezeichnung "finger-print Gebiet". Den gesamten übrigen Bereich bestimmt das spektrale Verhalten des Lösungsmittels. So werden die Absorptionen des Glucosemoleküls entweder von der H_2O -Absorption verdeckt oder sie liegen bei gleicher Wellenzahl, wie z.B. die $\nu(\text{OH})$ -Schwingung.

Da auch im Blutspektrum spezifische Absorptionsbanden nur in dem Bereich von $1650 - 900\text{ cm}^{-1}$ auftraten, beschränken sich die folgenden Untersuchungen auf das "finger-print Gebiet".

Während in den vorausgegangenen Messungen der Nachweis der Glucoseabsorption in H_2O geführt wurde, soll dieser nun in Blut erbracht werden. Einige Glucosebanden waren im Blutspektrum in Abb. 11 nicht mehr zu beobachten. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Werden diese Banden von der Absorption des Blutes verdeckt und erleiden ein ähnliches Schicksal wie z.B. die CH-Kombinationsschwingungen im NIR, die von der H_2O -Absorption überlagert werden?
- Welche Banden reagieren am empfindlichsten auf eine Erhöhung der Glucosekonzentration?

Für den Nachweis wird frisches Blut "gesüßt", d.h. der Blutzucker wird auf 9 g/dl erhöht. Eine so hohe Konzentration soll verhindern, daß sich schwache Absorptionen dem Nachweis entziehen. Beim Vergleich

des Spektrums mit Normalblut weisen die Absorptionsbanden auf eine Absorption des Glucosemoleküls hin, deren Intensität nach Konzentrationserhöhung zunehmen. Ferner erlaubt der Vergleich eine Aussage über das Maß der Empfindlichkeit, mit der die einzelnen Banden auf einen Anstieg reagieren. Damit ist eine Bestimmung der Banden möglich, die sich zu quantitativen Messungen eignen.

In einer Versuchsreihe wird das Verhalten der Absorptionsbanden im hyperglykämischen Bereich untersucht. Die Blutzuckerkonzentration wird sukzessive erhöht, wobei besonders auf die Intensitätsänderung der einzelnen Banden und auf deren relative Empfindlichkeit geachtet werden soll. Allerdings beschränkt die experimentell ermittelte Nachweisgrenze von ca. 130 mg/dl die Meßreihe auf den hyperglykämischen Bereich.

3.2 Experimentelle Bedingungen

Die Aufzeichnung fand unter den in den vorangegangenen Kapiteln erwähnten Bedingungen statt. Eine Konzentration von 9 g/dl ließ sich durch Zugabe von 90 mg fester D(+)-Glucose in 1 ml NaF-Blut herstellen.

Die Durchführung der Meßreihe geschah mit Blutzuckerwerten von 180, 360, 720 und 1440 mg/dl. In jeweils vier von fünf mit 0,5 ml NaF-Blut gefüllten Reagenzgläser wurde 10 µl einer 0,5-, 1-, 1,5- oder 2-molaren Glucoselösung pipettiert. Als Standard diente das Normalblut mit der Beigabe von 10 µl einer 0,9% NaCl-Lösung, um einen durch den Verdünnungseffekt bedingten Fehler der Messung auszuschließen.

Die Spektren wurden in aufsteigender Konzentration in fünffacher und der Bereich von $1150 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ in 20-facher Vergrößerung bei doppelter Abszissendehnung direkt übereinander aufgezeichnet.

Die Schichtdicke betrug $25 \mu\text{m}$. Ein Zerlegen der Küvetten während der Versuchsreihe erfolgte nicht, damit die Schichtdicke bei jeder Spektromaufnahme unverändert bleibt. Wird die Küvette nach jedem Versuch zur Reinigung zerlegt, ist die durch den Abstandsring gegebene Schichtdicke nicht mehr exakt gewährleistet, da diese auch von der beim Zusammenschrauben wirkenden Kraft abhängt. Gereinigt wurde die Küvette mit Aceton, H_2O und Druckluft.

3.3 Diskussion der Ergebnisse

3.3.1 Hohe Blutglucosekonzentration

Der Vergleich der beiden Blutspektren in Abb. 17 zeigt einen nur geringfügig veränderten Bereich von $1650 - 1180 \text{ cm}^{-1}$, dem sich das Gebiet der $\nu(\text{CO})$ -Schwingung mit intensiven Absorptionsbanden anschließt.

Eine Änderung der 1550 und 1400 cm^{-1} -Bande war nicht zu erwarten, da Glucose bei diesen Wellenzahlen keine Absorption aufweist. Die breite Absorptionsbande der $\delta(\text{CH}, \text{CH}_2, \text{CH}_3)$ -Schwingung läßt kleine Veränderungen erkennen. Während die Intensität der $\delta(\text{CH}_3)$ -Schwingung bei 1471 cm^{-1} verständlicherweise unverändert bleibt, tritt eine geringe Zunahme der $\delta(\text{CH}_2)$ -Absorption bei 1458 cm^{-1} ein. Die im Glucosespektrum deutliche $\delta(\text{CH})$ -Schwingung bei 1435 cm^{-1} ist im Blutspektrum durch keine Bande vertreten, ruft aber eine Abnahme der Durchlässigkeit bei dieser Wellenzahl hervor.

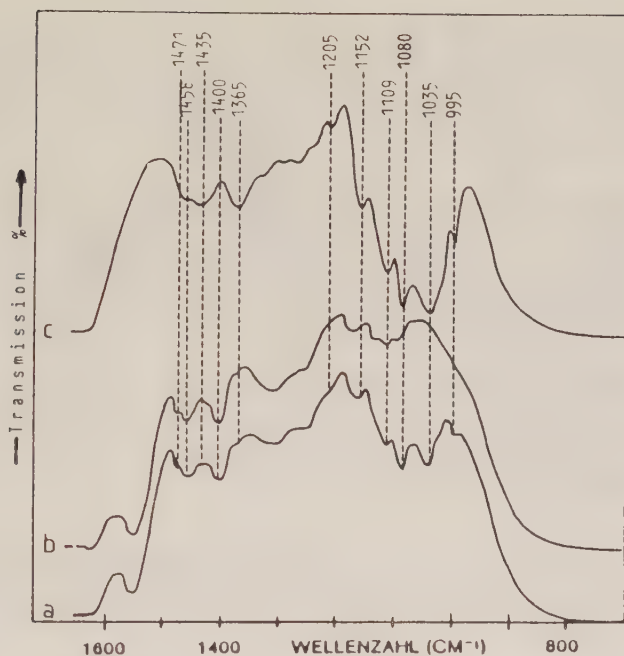


Abb. 17: Absorptionsspektren im Bereich von $1650-700 \text{ cm}^{-1}$ von:
 a) NaF-Blut mit einer Glucosekonz. von 9 g/dl
 b) NaF-Blut
 c) 2-molarer Glucoselösung

Die im Glucosespektrum (Abb. 17 c) mit einer intensiven Bande bei 1365 cm^{-1} imponierenden $\omega(\text{CH}_2)$ -Schwingung ist im Blutspektrum (Abb. 17b) nur noch als Schulter zu erkennen. Die Konzentrationserhöhung geht nicht mit einer Verbreiterung der Schulter einher und wird nur an einer diffusen Transmissionsabnahme um 1365 cm^{-1} erkennbar (Abb. 17a).

Der sich anschließende Bereich bleibt bis auf eine leichte Absorptionzunahme bei 1250 cm^{-1} unauffällig, ehe bei 1180 cm^{-1} der breite und intensive Absorptionsbereich der $\nu(\text{CO})$ -Schwingung beginnt, der sich bis 950 cm^{-1} erstreckt.

Das Maximum der 1170 cm^{-1} -Bande rückt bei einer Konzentrationserhöhung um 10 cm^{-1} nach tieferen Wellenzahlen. Ursache der Verschiebung ist die Zunahme der Glucosebande bei 1152 cm^{-1} , die in die 1170 cm^{-1} -Bande des Normalblutspektrums integriert ist.

Die Absorptionsbanden bei 1109 , 1085 und 1040 cm^{-1} zeigen von allen Glucosebanden die größte Absorptionzunahme. Die Maxima der 1085 - und 1040 cm^{-1} -Bande sind gegenüber dem Glucosespektrum um 5 cm^{-1} nach höheren Wellenzahlen gerückt.

Die 995 cm^{-1} -Absorption kann im Normalblutspektrum an einer leichten Schulter erkannt werden, die nach Konzentrationserhöhung als Plateau imponiert.

3.3.2 Meßreihe im hyperglykämischen Bereich

Abb. 18a zeigt die Spektren der verschiedenen Blutzuckerkonzentrationen in einem Bereich von 1650 - 800 cm^{-1} in fünffacher Vergrößerung. Sie weisen gegenüber dem Spektrum in Abb. 17 a bis 1180 cm^{-1} keine Veränderung auf, so daß sich die Kommentierung auf den $\nu(\text{CO})$ -Absorptionsbereich beschränkt, der in Abb. 18b in 20-facher Vergrößerung dargestellt wird.

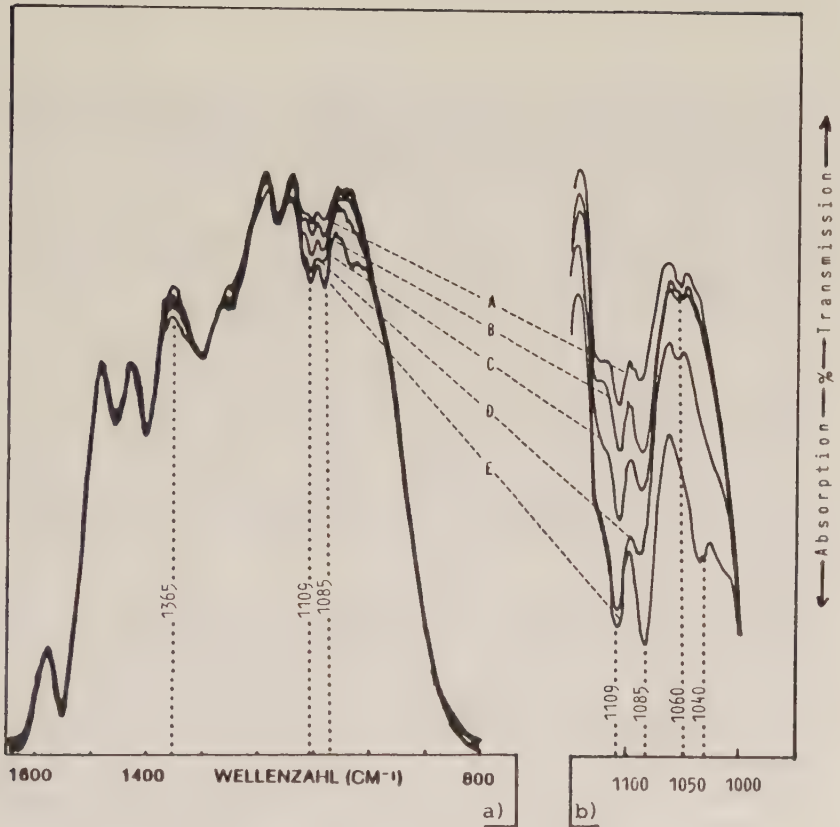


Abb. 18: Absorptionsspektrum von

- A) NaF-Blut
- B) NaF-Blut + 180 mg/dl Glucose
- C) NaF-Blut + 360 mg/dl "
- D) NaF-Blut + 720 mg/dl "
- E) NaF-Blut + 1440 mg/dl "

in a) fünfacher Vergrößerung

b) 20-facher Vergrößerung und doppelter Abszissendehnung

Die Absorptionsbanden bei 1060 und 1125 cm^{-1} zeigen keine Intensitätszunahme und werden von den sie umgebenden Banden bestimmt. Im Spektrum E sind sie nur noch als schwache Schultern zu sehen.

Die Absorptionsbanden bei 1109 und 1085 cm^{-1} reagieren auf jede Konzentrationserhöhung mit einer Zunahme der Absorption und besitzen von allen Absorptionsbanden die größte Empfindlichkeit.

Die im Glucosespektrum intensivste Bande bei 1035 cm^{-1} stellt sich im Normalblutspektrum (Abb. 18a) nur als Schulter bei 1040 cm^{-1} dar, die auf Konzentrationserhöhung anfangs nur sehr schwach reagiert, ehe sie im Spektrum E deutlich als Bande imponiert. Das Verhalten der Bande läßt auf eine Beteiligung der H-Brückenbindungen schließen. Mit der Konzentrationserhöhung nimmt nicht nur die Anzahl der $\nu(\text{CO})$ -Schwingungen, sondern auch die der H-Brücken zu, die von benachbarten Glucosemolekülen gebildet werden. Es kommt zu einer Koppelung mit der $\nu(\text{CO})$ -Schwingung [6]. Die H-Brücken bewirken eine Erhöhung der Bindungspolarisierung, die mit einer größeren Änderung des Dipolmoments während des Schwingungsvorgangs verbunden ist. Die Intensität und Breite der Absorption nehmen zu (Abb. 18A-E). Die Absorptionsänderung der 1040 cm^{-1} -Bande wird somit von der Zunahme der $\nu(\text{CO})$ -Schwingungen und den H-Brücken bestimmt. Erst mit der Intensitätssteigerung der 1040 cm^{-1} -Bande übertrifft die 1085 cm^{-1} -Absorption die 1109 cm^{-1} -Bande.

Alle Glucosebanden lassen sich, wenn auch z.T. nur bei hohen Konzentrationen, im Blutspektrum nachweisen und können zu quantitativen Messungen herangezogen werden. Eine Verbesserung der Meßempfindlichkeit ist mit Küvetten entsprechend geringer Schichtdicke oder einem IR-Generator mit einer höheren Strahlungsleistung möglich. So konnten

Kraus und Maier [30] mit einem CO₂-Laser und einer Küvettenschichtdicke von 100 µm noch die Konzentration einer wäßrigen Glucoselösung von 3,5 mg/dl bestimmen. Berücksichtigt man die für den Organismus erhöhte Wärmebelastung, die eine größere Strahlungsleistung mit sich bringt, um die Banden mit geringerer Empfindlichkeit den 1109 und 1085 cm⁻¹-Banden anzugleichen, so müssen für die in-vivo-Blutzuckermessung die Absorptionsbanden bei 1109 und 1085 cm⁻¹ als Banden I. Wahl angesehen werden. Zur II. Wahl gehören damit die Banden bei 1040, 1160 und 1365 cm⁻¹.

TEIL II: ABSORPTION DER RESTLICHEN IR-AKTIVEN BESTANDTEILE IM BLUT

1. Bestimmung der Absorptionsspektren der Bluteiweiße und des Harnstoffs

1.1 Einleitung

In Teil I dieser Arbeit wurden die Glucoseabsorptionsbanden im Blut ermittelt, die sich für die quantitative Messung eignen. Die Banden ließen sich durch Erhöhung des Blutzuckers, unter Zugabe von Glucose und Konstanthaltung der übrigen Blutbestandteile nachweisen. Die Transmissionsänderungen waren somit auf Absorptionen der Glucose zurückzuführen.

Eine Überlagerung der Glucoseabsorption durch eine andere Substanz kann mit dieser Technik nicht bewiesen werden. Solange die Konzentration dieser Substanzen konstant bleibt, ist mit einer Beeinflussung der Messung nicht zu rechnen. Diese Bedingung findet man jedoch im biologischen Milieu niemals vor. So können z.B. Infekte einen Anstieg der α_2 -Globulinfraction induzieren, wodurch bei Überlagerung mit der Glucoseabsorption ein erhöhter Blutzuckerwert angezeigt würde. Beim Versuch diese Pseudohyperglykämie zu therapieren (Insulinzufuhr), käme es beim Patienten eventuell zu einem hypoglykämischen Schock. Gerade der enge Spielraum der Blutglucosemessung im niedrigen Bereich und das plötzliche Eintreten des hypoglykämischen Schocks aus gutem Befinden stellt an die Messung hohe Anforderungen.

Die Messungen von Kaiser [25] und Kikuchi [28] wurden unter Konstanthaltung der übrigen Blutsustanzen vorgenommen. Ein Hinweis auf mögliche Überlagerungen der Glucoseabsorption fand sich in beiden Arbeiten nicht.

In den folgenden Kapiteln werden die Absorptionsspektren solcher Blutsubstanzen auf Überlagerung untersucht, deren Konzentrationen hoch genug sind, um eine Störung der Blutzuckermessung hervorrufen zu

können. Als Grenze wird die von Kraus und Maier [30] für einen CO₂-Laser-Spektrometer bestimmte Meßempfindlichkeit einer wäßrigen Glucoselösung von 3,5 mg/dl genommen. Hierunter fallen die Bluteiweiße Albumin, α -, β -, γ -Globulin und Hämoglobin, die Lipide und der Harnstoff.

1.2 Experimentelle Bedingungen

Die Spektrenaufnahmen fanden unter den bereits besprochenen Bedingungen statt.

Alle Proteine waren von der Firma Sigma Chemicals. Es handelte sich dabei ausschließlich um Humanproteine. Das bezogene Albumin wird der Cohn Fraktion V, die α - und β -Globuline werden der Cohn Fraktion IV und die γ -Globuline den Cohn Fraktionen III und II entnommen. Das Hämoglobin stammt von humanen Erythrozyten.

Jedes Protein wurde in 0,9% NaCl-Lösung gelöst. Eine Änderung des spektralen Verhaltens der 0,9% NaCl-Lösung gegenüber H₂O war nicht festzustellen.

Standardisierte Spektren ließen sich weder in den Katalogen von Sadtler und Aldrich, noch in der DMS-Kartei (Dokumentation der Molekülspektroskopie) finden. Als Vergleich diente die in den entsprechenden Kapiteln angegebene Literatur.

Die Vielzahl an Aminosäuren mit den entsprechenden schwingungsfähigen Atomgruppen, sowie die räumliche Struktur der Proteine rücken eine Interpretation der Banden in den Bereich der Spekulationen. So beschränken sich die Zuordnungen in der Literatur hauptsächlich auf die

charakteristischen Absorptionsbanden der Proteine, die von Schwingungen der Gerüstatome ausgehen. Die übrigen Banden sind meist kontrovers; deshalb wird auf die Zuordnung dieser Banden in der Arbeit verzichtet.

1.3 Ergebnisse und Diskussion

1.3.1 Hämoglobin

Der rote Farbstoff der Erythrozyten ist das Hämoglobin, das etwa ein Drittel der Zellmasse ausmacht. Neben der wichtigsten Funktion, Transport des Sauerstoffs, ist das Hämoglobin auch am Transport des Kohlendioxids und an der Pufferung zur Aufrechterhaltung der normalen Wasserstoffionenkonzentration im Extrazellulärraum beteiligt.

Hämoglobin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 64500, dessen Tertiär- und Quartärstruktur bekannt ist. Das Protein besteht aus vier Polypeptidketten, d.h. aus zwei α -Ketten mit je 141 und zwei β -Ketten mit jeweils 146 Aminosäuren. Jede Kette besitzt als prosthetische Gruppe das Häm-Molekül, ein Eisenprotoporphyrin, woran das Sauerstoffmolekül gelagert wird.

Die Bausteine der Proteine sind Aminosäuren, die über Peptidbindungen (Säureamidbindungen) miteinander verknüpft werden (Abb. 19). Die Sequenz der Aminosäuren, auch Primärstruktur genannt, bestimmt die räumliche Struktur des Proteins.

Die große Anzahl der Peptidbindungen (570 im Hb-Molekül) und die an dieser Bindung beteiligten Dipole C=O, C-N und N-H lassen eine intensive Absorption erwarten. Für die Bandenzuordnung zählt man die für die Amidgruppe charakteristischen Schwingungen mit römischen Ziffern durch.

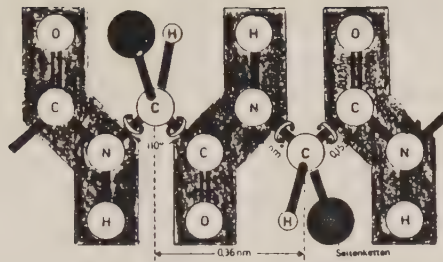


Abb. 19: Abmessungen (Längen und Winkel) einer vollständig gestreckten Polypeptidkette. Die vier mit einem Raster hinterlegten Atome liegen in einer Ebene und bilden die Amidgruppe (aus [34])

Das Spektrum wird mit den Ergebnissen von Melki [37] verglichen, der das Hb-Spektrum mittels der KBr-Technik aufzeichnete. Pulverisiertes Hb wird mit KBr-Pulver (Kaliumbromid) vermischt und unter Druck zu Mikropreßlingen geformt. Die Abwesenheit von H_2O gestattet eine Beobachtung von Absorptionsbanden, die in wäßriger Lösung verdeckt bleiben.

Die Amid-I-Bande fällt in die breite Absorption der $\delta(\text{OH})$ -Schwingung des Lösungsmittels bei 1650 cm^{-1} . Verursacht wird die Amid-I-Absorption von der $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung [14]. Erst bei 1550 cm^{-1} kann eine Absorption des Hb-Moleküls beobachtet werden, die aus einer $\nu(\text{C}-\text{N})$ - und $\delta(\text{C}-\text{N}-\text{H})$ -Schwingung der Amidgruppe resultiert. Die Kombination der beiden Schwingungstypen wird als Amid-II-Absorption bezeichnet [55].

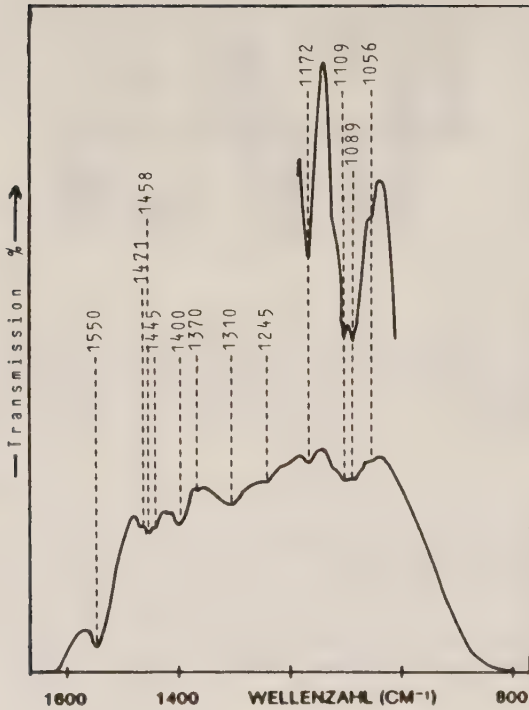


Abb. 20: Absorptionsspektrum einer Hämoglobinlösung (16 g/dl). Das obere Spektrum zeigt den Bereich von 1200 - 1000 cm^{-1} in 20-facher Vergrößerung.

In einer breiten Absorption mit einem Maximum bei 1458 cm^{-1} sind zwei Plateaus bei 1471 und 1445 cm^{-1} integriert. Die Banden beruhen auf Absorptionen der $\delta(\text{CH}, \text{CH}_2, \text{CH}_3)$ -Schwingungen. Der Schulter bei 1421 cm^{-1} folgt eine schmale, intensive Bande bei 1400 cm^{-1} , die der symme-

trischen Streckschwingung der COO^- -Gruppe zugeordnet wird [55]. Auf eine schwache Absorption läßt die Schulter um 1370 cm^{-1} schließen, die ihre Ursache in der $\omega(\text{CH}_2)$ -Schwingung hat. Nach einer kurzen Transmissionszunahme kommt eine breite, diffuse Absorption mit einem Maximum bei 1310 cm^{-1} , deren Zuordnung unklar ist. Sicherlich wird diese breite Absorption von verschiedenen Schwingungen verursacht, wobei die gegenüber den anderen Eiweißen größere Intensität für eine starke Beteiligung der $\nu(\text{C-N})$ -Schwingung aromatischer Amine spricht, wie sie in den Aminosäuren Histidin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan oder auch im Porphyrinring vorkommen [17].

Die Kombination der $\delta(\text{N-H})$ - und $\delta(\text{O-C-N})$ -Schwingung gilt als Amid-III-Absorption und wird bei 1245 cm^{-1} erwartet [37]. Der Absorptionsbereich von $1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ zeigt jedoch im Glucosespektrum die gleiche Form und weist somit auf eine geringe Intensität der Amid-III-Bande hin.

Die 20-fache Vergrößerung (Abb. 20) zeigt bei 1172 cm^{-1} eine deutliche Bande, die der $\nu(\text{C-N})$ -Schwingung von Aminosäuren zugeordnet wird, deren unverzweigte Seitenkette eine Aminogruppe trägt (Lysin, Glutamin, Arginin, Asparagin) [17].

Ein breiter, intensiver Absorptionsbereich erstreckt sich von 1140 cm^{-1} bis 1050 cm^{-1} . Er enthält zwei Maxima bei 1109 und 1089 cm^{-1} , zwei Schultern um 1125 und 1056 cm^{-1} . Die 1109 cm^{-1} -Bande kann in keinem der anderen Proteinspektren nachgewiesen werden. Dies läßt als Ursache auf eine Absorption der prostethischen Gruppe des Hämoglobins, dem Häm, schließen. Im Vergleich mit dem Albuminspektrum (Abb. 21) zeigt die Bande bei 1089 cm^{-1} eine viel stärkere Absorption, so daß neben der $\nu(\text{CO})$ -Schwingung eine Beteiligung des Häm-Moleküls wahr-

scheinlich erscheint. Weitere Absorptionen sind nicht mehr zu beobachten. Auch das Spektrum von Melki weist erst wieder bei 985 cm^{-1} eine Absorption auf.

Alle in Kapitel I.3.3 ermittelten Glucosebanden werden mit Ausnahme der 1035 cm^{-1} -Bande von Absorptionen des Hämoglobins überlagert.

1.3.2 Albumin

Die Albumine stellen mit 55-65% (3,5-5 g/dl) die Hauptfraktion der Plasmaproteine. Auf Grund ihrer relativ großen Konzentration und ihrer kleinen Molekülgröße sind sie für fast 80% des kolloidosmotischen Druckes im Plasma verantwortlich. Ihre große Gesamtoberfläche befähigt sie in besonderem Maße zur Bindung einer Reihe von Substanzen, die sie als Träger im Blut transportieren.

Der Albuminspiegel ist von der Syntheserate der Leber und dem Proteinverlust abhängig. Eine schwere Leberparenchymerkrankung (Zirrhose) kann ebenso, wie ein Verlust über die Niere (nephrotisches Syndrom) oder ein erhöhter Verbrauch, wie man ihn bei konsumierenden Krankheiten vorfindet, zu einer Hypalbuminämie führen. Bei Überschneidung mit der Glucoseabsorption würde ein zu geringer Blutzuckerwert gemessen werden. Die daraus resultierende Verminderung der Insulinsekretion hätte eine Zunahme der Blutglucose zur Folge.

IR-spektroskopische Untersuchungen von Albumin wurden bereits von Stewart [50] und Palm [38] vorgenommen. Während bei Stewart die Absorption des Wassers über einen Referenzstrahlengang kompensiert wurde, fand bei Palm das Filmverfahren Anwendung. Hierbei wird die Trockensubstanz in H_2O gelöst und auf eine infrarot-durchlässige Unterlage verbreitet und getrocknet.

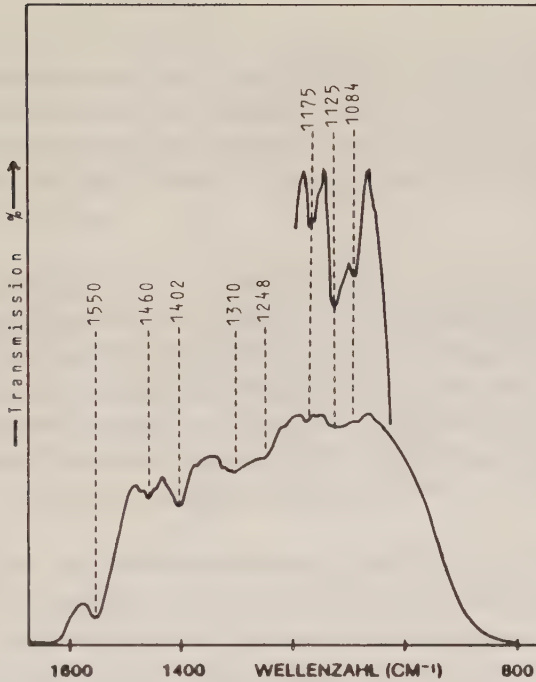


Abb. 21: Absorptionsspektrum einer Albuminlösung (15 g/dl)
oben: Der Bereich von $1200\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$ in 20-facher
Vergrößerung

Die Absorption bei 1550 cm^{-1} , die von den Schwingungen der Gerüstato-
me ausgeht, zeigt gegenüber dem Hb-Spektrum eine etwas geringere In-
tensität. Auf eine unterschiedliche Aminosäuresequenz mit einer Domi-
nanz der hydrophilen Aminosäuren weisen die Banden bei 1460 und 1402
 cm^{-1} hin. Die von den $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$ -Schwingungen verursachte Absorption
bei 1402 cm^{-1} überragt die der hydrophoben CH-Gruppen um 1460 cm^{-1} an

Intensität deutlich. Das Hb-Spektrum (Abb. 20) zeigt dagegen ein Überwiegen der $\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH})$ -Schwingungen. Dieses Ergebnis entspricht der besonderen Funktion des Albumins. Als Trägerprotein mit einer großen Oberfläche sorgen hydrophile Gruppen für eine gute Löslichkeit.

In dem Bereich zwischen 1200 und 1000 cm^{-1} gibt es deutliche Unterschiede. Die Absorption bei 1175 cm^{-1} ist auch im Hb-Spektrum in gleicher Stärke vorhanden. Das Maximum des Bereichs liegt bereits bei 1125 cm^{-1} . Eine Absorption bei 1109 cm^{-1} ist nicht feststellbar. Anders als bei Hämoglobin läßt sich die 1084 cm^{-1} -Bande nur schwach darstellen. Eine schwache Schulter schließt sich um 1055 cm^{-1} an, ehe die H_2O -Absorption weitere Banden verdeckt.

In den Spektren von Stewart und Palm erscheint bei 1035 cm^{-1} ebenfalls keine Bande.

1.3.3 α -, β -Globulin

Mit dem Begriff Globulin wird eine ganze Gruppe von elektrophoretisch trennbaren Proteinen gekennzeichnet und nach der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld als α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globulin unterschieden. Doch repräsentieren auch diese Unterfraktionen noch keine einheitlichen Eiweißkörper. Mit anderen Trennverfahren wie z.B. Immunelektrophorese lassen sie sich weiter auftrennen.

Mit der Untergruppe der α_1 -Globuline wandert eine Reihe von konjugierten Proteinen, die Kohlenhydrate als prosthetische Gruppe besitzen und unter dem Namen Glykoproteine zusammengefaßt werden. Eine andere Gruppe von kohlenhydrathaltigen Proteinen dieser Unterfraktion bilden die Mucoproteine.

Der Hauptteil der Lipoproteine läßt sich in der β -Globulinfraktion finden. Ihre große funktionelle Bedeutung resultiert aus der Fähigkeit, die nicht wasserlöslichen Fette und Lipide im Blut zu transportieren. Außer den Lipoproteinen wandert noch eine Gruppe metallbindender Proteine in der β -Fraktion, unter ihnen das als Träger von Eisen dienende Transferrin.

Eine Einschränkung der Syntheseleistung der Leber geht meist mit einer Verminderung der α - und β -Globulinkonzentration einher. Für die Blutzuckerbestimmung weitaus bedeutsamer ist das Ansteigen der α -Globuline bei akut entzündlichen Erkrankungen, die bei Diabetikern, begünstigt durch die allgemeine und lokale Abwehrschwäche, gehäuft beobachtet werden. Bei Überlagerung mit der Glucosebanke würde dann ein zu hoher Blutzuckerwert angezeigt werden.

Abb. 22 zeigt das Absorptionsspektrum einer α - und β -Globulinlösung mit einer Konzentration von 6 g/dl. Die Amid-II-Bande kommt schon bei 1560 cm^{-1} zum Vorschein. Das Spektrum zeigt mit dieser, gegenüber der physiologischen dreifach erhöhten Konzentration nur schwache Absorptionen. Die ansonsten gut beobachtbaren Beugeschwingungen der CH-Gruppen sind nur an einem Plateau um 1470 cm^{-1} zu erkennen, dem sich eine kleine Schulter bei 1445 cm^{-1} anschließt. Der deutlichen Absorptionsbande bei 1402 cm^{-1} folgt eine diffuse Absorption, die sich bis 1300 cm^{-1} erstreckt.

In der 20-fachen Vergrößerung ist eine schwache Absorption bei 1170 cm^{-1} erkennbar, die in die 1125 cm^{-1} -Bande integriert ist. Ein Plateau um 1080 cm^{-1} weist auf Absorptionen hin.

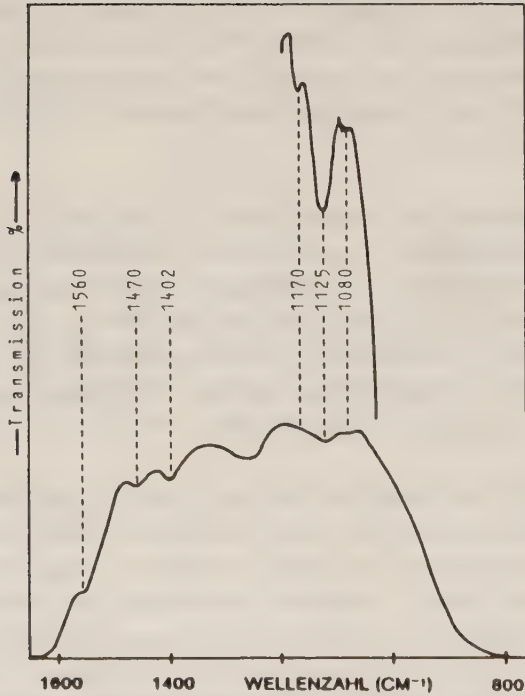


Abb. 22: Absorptionsspektrum einer α - β -Globulinlösung (6 g/dl)
oben: 20-fache Vergrößerung des Bereichs von
1200 - 1030 cm^{-1} .

Weitere Absorptionen tauchen weder im Spektrum, noch in den Ergebnissen von Stewart [50] auf. Die Schulter um 1000 cm^{-1} darf nicht als eine Absorption gedeutet werden, da sie auch im H_2O -Spektrum (Abb. 5) in gleicher Lage und Form zu erkennen ist. Absorptionen in diesem

Bereich sind aber dennoch nicht auszuschließen. Der Anteil der Kohlenhydrate der Glyko- und Mucoproteine ist allerdings zu gering, um von der Meßempfindlichkeit des Gerätes erfaßt zu werden.

1.3.4 γ -Globulin

Die in der Elektrophorese einheitliche Fraktion der γ -Globuline läßt sich durch Immunelektrophorese in fünf Immunglobulinklassen auftrennen, die zwar einen prinzipiell gleichen Aufbau zeigen, sich aber durch die Aminosäuresequenz einzelner Abschnitte, ihren Kohlenhydratgehalt, Molekulargewicht und biochemische Funktionen unterscheiden. Sie werden als IgG, IgA, IgM, IgD und IgE bezeichnet.

Die Immunglobuline haben an dem sogenannten Fc-Fragment jeweils zwei verzweigte, aus Hexosen bestehende Kohlenhydratketten gebunden, die beim IgM mit einem Anteil von 10,9% des Gesamtmoleküls am höchsten ist.

Gemäß ihrer besonderen Aufgabe, Antigene zu binden, sind die funktionellen Schwankungen in Menge und Zusammensetzung der γ -Globulinfraktion sehr groß, da es fast bei allen - besonders entzündlichen - Erkrankungen zu einer Vermehrung der γ -Globuline kommt.

Das Spektrum der γ -Globuline (Abb. 23) weist gegenüber den in vorhergehenden Kapiteln besprochenen Proteinen einige Veränderungen auf. So sind die Amid-II- und die COO^- -Bande um jeweils 15 cm^{-1} nach höheren Wellenzahlen verschoben.

Auch in einer so hohen Konzentration lassen sich die Beugeschwingungen der CH-Gruppen nur schwach darstellen. Die gute Löslichkeit der γ -Globuline drückt sich durch ein Überwiegen der Absorption der hydro-

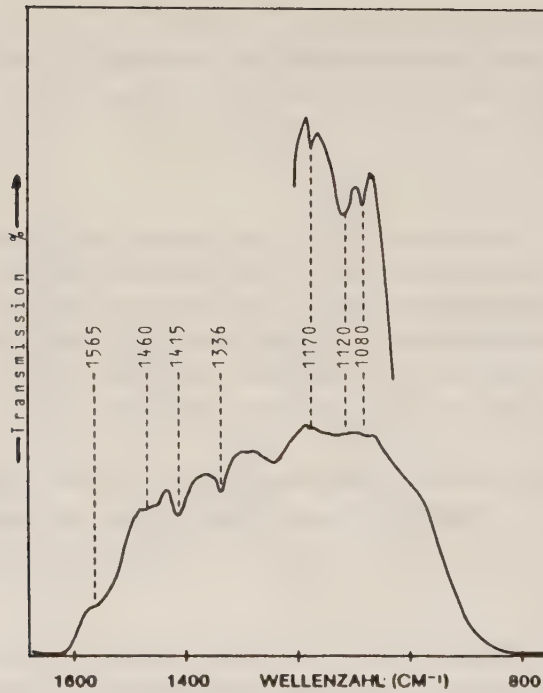


Abb. 23: Absorptionsspektrum einer γ -Globulinlösung (10g/dl)
oben: 20-fache Vergrößerung des Bereichs von $1200\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$

philen Gruppen bei 1415 cm^{-1} aus. Unerwartet ist die Lage und Intensität der Bande bei 1336 cm^{-1} . Die in den Proteinspektren beobachtbaren Absorptionen bei 1370 und 1310 cm^{-1} fehlen hier, wie auch in den Spektren von Stewart [50] und Palm [39]. Vermutlich ist die andersartige Konformation der Immunglobuline (β -Helix und antiparallele Faltblattstruktur) für diese Absorptionsbande verantwortlich. Angesichts

der schwachen Absorption der Amid-II-Bande kommt die Amid-III-Absorption als alleinige Ursache der intensiven Bande bei 1240 cm^{-1} nicht in Frage.

Erst die 20-fache Vergrößerung gibt über den Bereich von $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ Auskunft. Der schwachen Absorption um 1170 cm^{-1} schließen sich zwei Banden bei 1120 und 1080 cm^{-1} mit geringer Intensität an. Der Anteil der Kohlenhydrate läßt Absorptionen im Bereich von $1080\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ vermuten, die aber von so geringer Intensität sind, daß die Meßempfindlichkeit des IR-Spektrophotometers zu deren Nachweis nicht mehr ausreicht. Palm [39] berichtet von einer schwachen Absorption bei 1015 cm^{-1} , die aber erst bei einer γ -Globulin-Konzentration von 30 g/dl registriert werden konnte.

1.3.5 Harnstoff

Der in den Leberzellen in einem mehrstufigen Kreisprozeß aus Ammoniak, Bicarbonat und dem α -Aminostickstoff von Aspartat gebildete Harnstoff ist das Endprodukt des Amino- und Proteinstoffwechsels. Mit einer Konzentration von $10 - 50\text{ mg/dl}$ Plasma kann Harnstoff bei Überlagerung mit einer Glucosebande für falsche, vor allem zu hohe Werte verantwortlich sein. Die Harnstoffkonzentration ist abhängig von der Eiweißzufuhr, dem Katabolismus und der renalen Ausscheidung.

Harnstoff ist ein Carbonsäurediamid und gehört zu der Gruppe der primären Amide. Die Lage der Amid-II-Bande ist bei primären Amiden im Gegensatz zu sekundären nach höheren Wellenzahlen verschoben. So kommt die Amid-II-Bande im Spektrum von festem Harnstoff [48] bei 1625 cm^{-1} zu liegen. Die $\delta(\text{OH})$ -Bande bei 1650 cm^{-1} zeigt in Abb. 24 eine Verbreiterung, welche an einem verspäteten Anstieg der Transmission nach 1600 cm^{-1} erkennbar ist. Wird das Lösungsmittel kompensiert, erscheint die Amid-II-Bande bei 1617 cm^{-1} [33].

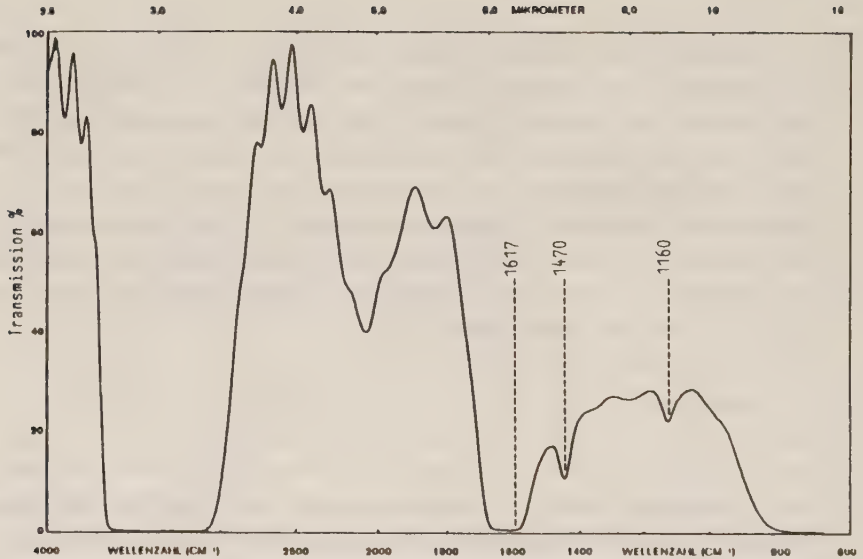


Abb. 24: Absorptionsspektrum einer 1-molaren Harnstofflösung

Ursache der 1470 cm^{-1} -Bande ist möglicherweise eine Beugeschwingung des Molekülskeletts. Sie tritt nur bei primären Amiden auf und heißt Amid-VI-Absorption [17]. Eine Schaukelschwingung der NH_2 -Gruppe ruft die Absorption bei 1160 cm^{-1} hervor. In der Empfindlichkeit der 1160 cm^{-1} -Bande bezüglich Konzentrationsänderungen sieht Laulicht [33] einen Beweis für die Mitbeteiligung der C=O -Gruppe an der Absorption.

Im Spektrum von festem Harnstoff kann bei 1063 cm^{-1} eine schwache Absorption beobachtet werden, die in Lösung nicht mehr nachzuweisen ist.

Der Bereich von $4000 - 1650\text{ cm}^{-1}$ entspricht dem H_2O -Spektrum. Die Peaks um 3900 und 2500 cm^{-1} beruhen auf Interferenzbildung, deren Ursache bereits in Kap. 3.2 beschrieben wurde.

Eine Störung der Blutzuckermessung durch Überlagerung von Absorptionen des Harnstoffs ist somit nicht zu erwarten. Das Spektrum weist vielmehr eine charakteristische, in den Spektren der Proteine und Glucose nicht nachweisbare Absorption mit einem Maximum bei 1617 cm^{-1} auf. Daher eignet sich diese Bande zur quantitativen Bestimmung der Harnstoffkonzentration.

2. Vergleich der Spektren von Hämoglobin, Blut, Plasma und einer Eiweißlösung

2.1 Einleitung

Eine Interpretation des in Kapitel I. 1.3.3 ermittelten Spektrums von Blut ist nun in Kenntnis des Absorptionsverhaltens der Proteine möglich. Das Spektrum wird im Vergleich mit Hämoglobin, das alle Absorptionsbanden der Proteine und der Glucose beinhaltet, auf zusätzliche Absorptionen untersucht. Diese Banden können dann auf Absorptionen der Lipide, insbesondere der Membranlipide zurückgeführt werden, die im Blut als Bestandteil der corpusculären Elemente in hoher Konzentration vorkommen.

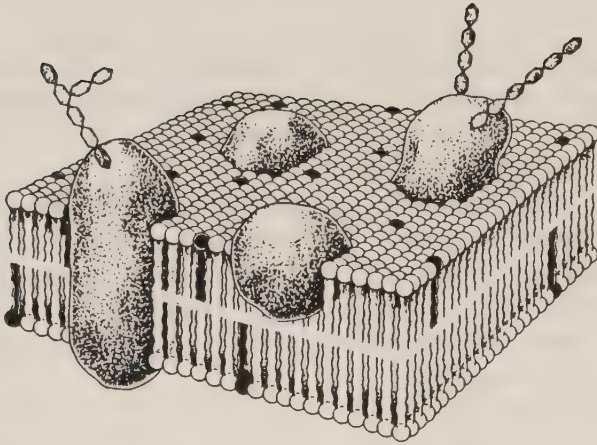


Abb. 25: Schematische Darstellung des Membranmodells nach Singer und Nicolson (1972). In der Lipiddoppelschicht aus Phosphoglyceriden und Sphingolipiden (schwarz hervorgehoben) schwimmen Membranproteine, die häufig Kohlenhydratseitenketten tragen (aus [34])

Abb. 25 zeigt das Modell einer Zellmembran. Der Anteil der Lipide gegenüber den Proteinen ist bei der Erythrozytenmembran auf nahezu das dreifache erhöht [34].

Neben den Membranlipiden besitzen die Lympho-, Leuko- und Thrombozyten noch DNA und RNA, die ebenfalls IR-aktiv sind und mit Banden imponieren können. Ihre vergleichsweise geringe Konzentration macht eine sichtbare Absorption jedoch nicht wahrscheinlich.

Der Vergleich mit Plasma zeigt den Einfluß der Blutzellen auf das Spektrum. Durch Gegenüberstellung der Spektren von Plasma und Eiweißlösung wird nochmals versucht, Absorptionsbanden des Plasmas zu finden, deren Entstehen nicht auf Absorptionen der Proteine zurückzuführen ist.

2.2 Experimentelle Bedingungen

Blut und Plasma stammten vom selben Patienten. Die Konzentration der Plasmaproteine und Fette setzte sich wie folgt zusammen:

Gesamteiweiß	:	7,20 g/dl	
Albumin	:	4,57 g/dl	= 63,5%
α_1 -Globulin	:	0,27 "	= 3,8%
α_2 -Globulin	:	0,54 "	= 7,5%
β -Globulin	:	0,89 "	= 12,3%
γ -Globulin	:	0,93 "	= 12,9%

Cholesterin: 185 mg/dl; Triglyceride: 72 mg/dl; Glucose: 83 mg/dl

Von den Plasmaproteinen wurde eine wäßrige Lösung hergestellt, die in etwa dem physiologischen Vorkommen entspricht.

Gesamteiweiß	:	6,5 g/dl	
Albumin	:	4 "	
$\alpha+\beta$ -Globulin	:	1,5 "	
γ -Globulin	:	1 "	

Es erfolgte eine Konzentrationserhöhung der Hämoglobininlösung auf 22 g/dl. Damit erreicht sie annähernd die Proteinkonzentration des Blutes, die hauptsächlich von Hb, den Plasma- und Membranproteinen bestimmt wird.

Die Spektrenaufnahme geschah unter den bekannten Bedingungen.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Blut - Hämoglobin

Die etwas kleinere Absorptionstiefe der Amid-II-Bande des Blutes zeigt, daß die Proteinkonzentration des Blutes nicht genau der Hb-Konzentration entspricht, sondern etwas niedriger liegt (Abb. 26). Das Blutspektrum weist gegenüber dem Hämoglobin, die Intensitäten der Banden betreffend, nur minimale Veränderungen auf. Zusätzliche Absorptionen sind nicht festzustellen. Jede Bande, jede Schulter findet ihr Pendant in dem Hb-Spektrum wieder.

Das Blutspektrum hat im Bereich von $1500 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ eine insgesamt geringere Durchlässigkeit, wobei aber die Stärke der Banden unverändert bleibt. Bei 1370 cm^{-1} läßt sich eine Absorptionszunahme beobachten, die von der Nickschwingung der CH_2 -Gruppe verursacht wird. Eine verstärkte Absorption der $\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH})$ -Schwingungen bei 1460 cm^{-1} bleibt dagegen aus.

Die hohe Hb-Konzentration der Lösung ruft eine starke Zunahme der Banden bei 1109 und 1089 cm^{-1} hervor und übertrifft die Absorptionen im Blutspektrum deutlich, während die Intensität der Proteinbande bei

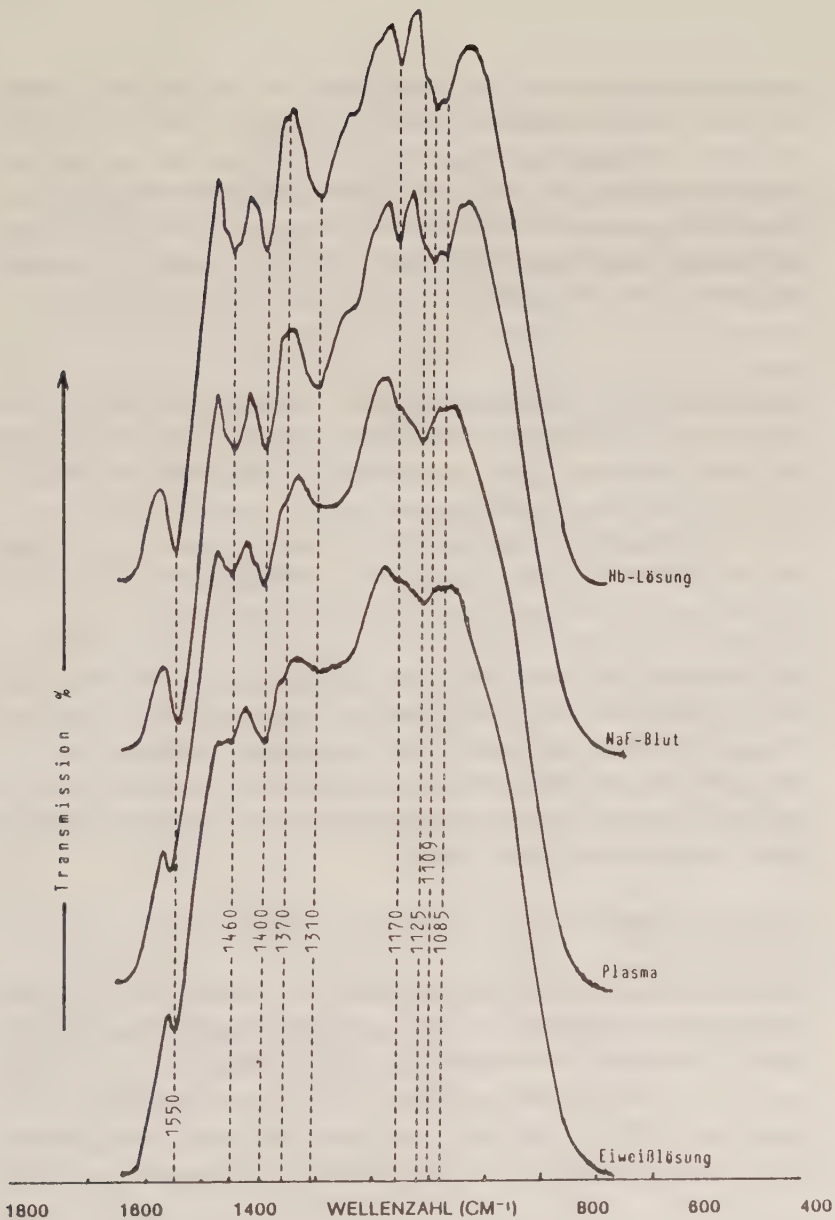


Abb. 26: Absorptionsspektren in 5-facher Vergrößerung einer Hb-Lösung (22 g/dl), NaF-Blut, Plasma und Eiweißlösung

1125 cm^{-1} annähernd der des Blutspektrums entspricht. Mit Ausnahme der beiden Absorptionsbanden vermag das Hb-Spektrum in keinem Bereich eine stärkere Absorption als das Blut zu erzielen, obgleich die Blutproteinkonzentration niedriger ist. Dies spricht für die Beteiligung einer Schwingung, die nicht von dem Proteingerüst oder den Aminosäuren ausgeht. Damit wird die in Kapitel II 1.3.1 geäußerte Vermutung unterstützt, die die Banden auf Absorptionen des Häm-Moleküls zurückführt.

Arrondo et al. [2] berichten von einer Absorption der Phospholipide bei 1082 cm^{-1} , hervorgerufen von der $\nu_{\text{sym}}(\text{PO}_2^-)$ -Schwingung. Sie kann hier weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist sie, neben der Konzentrationsabnahme und der Ungenauigkeit der Auflösung des IR-Spektrophotometers, für die Verschiebung der im Hb-Spektrum bei 1089 cm^{-1} liegenden Bande nach tieferen Wellenzahlen verantwortlich. Im Blutspektrum erscheint die Bande bei 1085 cm^{-1} .

Die Absorption bei 1060 cm^{-1} ist in beiden Spektren nachweisbar. Kaiser [25] sieht in dieser Bande eine Absorption des Cholesterins. Tatsächlich besitzt Cholesterin eine mittelstarke Bande bei 1055 cm^{-1} [49], die aber von Absorptionen der Bluteiweiße überlagert wird, so daß die Bedeutung der Cholesterinabsorption am Zustandekommen der Bande nicht angegeben werden kann.

2.3.2 Blut-Plasma

Der Vergleich der beiden Spektren beweist die Dominanz der Hämoglobinabsorption. Das Plasmaspektrum ist über den gesamten Bereich durchlässiger. Die geringere Intensität der Amid-II-Bande trägt dem Fehlen des Hämoglobins Rechnung. Eine weniger deutliche Ausprägung haben die Banden bei 1459 und 1404 cm^{-1} , doch sind die integrierten Absorptionen bei 1470 und 1445 cm^{-1} , sowie 1421 cm^{-1} gut zu sehen. Der Absorp-

tionsbereich um 1300 cm^{-1} läßt allerdings keine Einzelheiten mehr erkennen und dehnt sich diffus von $1330 - 1250\text{ cm}^{-1}$ aus.

Die im Blutspektrum deutliche Bande bei 1170 cm^{-1} erscheint nur noch als Schulter. Das Maximum des Absorptionsbereichs von $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ stellt die Bande bei 1126 cm^{-1} dar. Im Plasmaspektrum ist die Bande bei 1109 cm^{-1} , die von der Hb-Absorption verursacht wird, nicht mehr zu beobachten. Mit 82 mg/dl ist die Konzentration von Glucose zu gering, um eine registrierbare Absorption hervorzurufen. Die Absorption bei 1084 cm^{-1} zeigt sich nur sehr schwach, ist aber noch als Bande erkennbar. Die geringe Absorption bei 1060 cm^{-1} ist im Plasmaspektrum nicht mehr nachzuweisen.

2.3.3 Eiweißlösung - Plasma

Die kleinere Amid-II-Bande im Spektrum der Eiweißlösung weist auf eine niedrigere Proteinkonzentration hin, die aber nicht die Ursache der vergleichsweise äußerst schwachen Absorption um 1470 cm^{-1} darstellt. Die geringe Intensität läßt vielmehr auf das Fehlen der CH-Beugeschwingung der Lipide schließen. Im Plasmaspektrum rufen sie, zusammen mit den CH-Schwingungen der Proteine, eine viel stärkere Absorption hervor.

Das Proteinspektrum zeigt gegenüber dem Plasmaspektrum dasselbe Absorptionsverhalten. Die Lage und Form der Banden und Schultern sind gleich, verfügen jedoch im Plasmaspektrum über eine etwas stärkere Intensität. Da, mit Ausnahme der 1470 cm^{-1} -Absorption, das gesamte Plasmaspektrum betroffen ist, kann als Ursache der verstärkten Absorption die höhere Plasmaproteinkonzentration angesehen werden.

Das Absorptionsverhalten des Blutes wird also eindeutig von der Absorption der Proteine, insbesondere des Hämoglobins, bestimmt. Unspezifische Lipidabsorptionen fanden sich nur für die Banden bei 1460 und 1370 cm^{-1} , die von Schwingungen der CH-Gruppen hervorgerufen werden. Der Einfluß der Lipide darf mit Sicherheit als gering bezeichnet werden. Da die Meßempfindlichkeit eines Sensors aber mindestens um den Faktor 10 höher sein muß, kann eine Störung durch die dann möglicherweise nachweisbaren Lipidabsorptionen nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

Dem Ziel der Entwicklung eines künstlichen endokrinen Pankreas trägt die Aufgabenstellung dieser Arbeit Rechnung. Den entscheidenden Baustein einer solchen Einheit (Abb. 1) stellt der Sensor dar. Das Meßprinzip macht von der Eigenschaft jeder Substanz Gebrauch, Licht bestimmter Wellenlänge zu absorbieren. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt die Höhe der Absorption die gesuchte Konzentration.

Aufgabe dieser Arbeit war, die von Glucose absorbierten Wellenlängen im NIR- und MIR-Bereich ($0,8 - 16,5 \mu\text{m} = 12500 - 600 \text{ cm}^{-1}$) zu ermitteln. Diese können nur in einem kleinen Gebiet, das sich von $1650 - 800 \text{ cm}^{-1}$ erstreckt, nachgewiesen werden und sind in Tabelle II aufgeführt. Den übrigen Bereich bestimmt die hohe Absorption des Wassers.

Die so festgestellten Glucosebanden zeigen im Blut nach Konzentrationserhöhung eine unterschiedliche Absorptionszunahme. Für die Banden bei 1109 und 1085 cm^{-1} wird, vor allem bei geringen Konzentrationen, die größte Empfindlichkeit registriert, gefolgt von den Absorptionen bei 1040 , 1160 und 1370 cm^{-1} .

Der Einfluß der Antikoagulantien und der einzelnen Blutbestandteile auf das Blutglucosespektrum ist bisher noch nicht untersucht worden. Der Vergleich der Spektren von Heparin-, EDTA-, NaF- und Citratblut (Abb. 12) zeigte keine Absorptionsbande der Antikoagulantien im Bereich von $1650 - 600 \text{ cm}^{-1}$. Damit ist eine Störung der Glucosebandenbestimmung durch die Antikoagulantien ausgeschlossen. Das spektrale Verhalten einzelner Blutsubstanzen ist in Teil II untersucht und auf Überschneidungen mit den Glucosebanden überprüft worden. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle II zu finden. Dabei werden, mit Ausnahme der 1040 cm^{-1} -Bande, alle Glucosebanden von Absorptionen überlagert. Eine Interferenz mit der 1040 cm^{-1} -Bande ist jedoch nicht auszuschließen. Wie das Spektrum von pulverisiertem Hämoglobin [37] zeigt, ist eine Absorption der Proteine in diesem Gebiet nicht zu erwarten.

Tabelle II: Zusammenstellung der Absorptionsbanden der untersuchten Substanzen (in cm^{-1}).

Hämoglobin	Albumin	α -Glo- bulin	γ -Glo- bulin	Harn- stoff	2m-Glu- coselsg.	Glucose im Blut*	Blut	Plasma	günstigster Bereich zur Messung von
				1617					Harnstoff
1550	1550	1560	1565				1550	1554	Proteine
1471	1470	1470		1470			1471	1470	CH_3 -
1458	1460	1460	1460		1458	1458	1458	1459	CH_2 -gruppenhaltigen
1445	1445	1445			1435	1435	1445	1445	CH - Molekülen
1421	1420						1421	1421	
1400	1402	1402	1415				1400	1404	Proteine
1370	1370	1370			1365	1365	1370	1370	Glucose
				1336					γ -Globulin
1310	1310	1310			1325		1308	1310	
					1300				
1265	1265				1252		1265		
		1250							
1240	1248		1240		1240		1242	1247	
1215	1215				1205	1215	1215		
1172	1175	1170	1170				1170	1170	
				1160		1160			Glucose
					1152				
1125	1125	1125	1120				1125	1126	
1109					1109	1109	1109		Hämoglobin
									Glucose
1089	1084	1080	1080		1080	1085	1085	1084	Glucose
1056	1055				1060	1060	1060	1060	
					1035	1040			Glucose
					1015				
					996	990	995		

*) Es werden nur die Absorptionsbanden aufgeführt, die nach Glucosezugabe eine Extinktionszunahme zeigen.

Der hohe Kohlenhydratanteil der γ -Globuline, der Glyko- und Mucoproteine läßt allerdings eine schwache Absorption vermuten, die sich jedoch der Meßempfindlichkeit entzieht.

Weitere Untersuchungen mit empfindlicheren Geräten müssen sich anschließen, um die Größe einer eventuellen Störung der Glucosemessung seitens der Kohlenhydrate oder auch der Lipide zu erfassen.

Den Einfluß der Lipide darf man mit Sicherheit als gering bezeichnen. Ihre Absorptionen werden eindeutig von den Proteinen überragt. Eine spezifische Lipidabsorptionsbande im Blutspektrum ist nicht festzustellen.

Die Blutzuckerbestimmung kann nur bei 1040 cm^{-1} ohne Hilfsmessung vorgenommen werden. Eine Messung an einer der oben genannten Wellenzahlen ergibt neben der Glucose noch die Konzentration der überlagernden Substanz an. Damit geht eine Konzentrationserhöhung der Substanz mit einer fälschlicherweise erhöhten Blutzuckeranzeige einher. Als fatale Folge der Gegenregulation droht dann der hypoglykämische Schock.

Im folgenden werden zwei Methoden vorgeschlagen, die den störenden Einfluß der Proteinabsorption kompensieren sollen.

Kikuchi et al. [28] nahmen ihre quantitativen in-vitro Blutglucosemessungen bei der Wellenzahl 1080 cm^{-1} vor. Da, wie aus Tabelle II zu entnehmen, alle Proteine um 1085 cm^{-1} eine Absorption zeigen, genügt es, eine "Proteinbande" zu finden. Die Proteinkonzentration kann bei dieser Wellenzahl bestimmt werden. Besonders gut erfüllt diese Bedingung die Amid-II-Bande, die von Schwingungen des Proteingerüsts, den Peptidbindungen, verursacht wird. Die Absorptionswerte der 1550 und

1085 cm^{-1} -Bande werden der Verrechnungseinheit des künstlichen endokrinen Pankreas zugeleitet. Sie bestimmt die Proteinkonzentration bei 1550 cm^{-1} und die Protein- und Glucosekonzentration bei 1085 cm^{-1} . Die Differenz beider Werte ergibt die Blutzuckerkonzentration.

Der Tabelle II sind noch zwei Wellenzahlen zu entnehmen, die von Proteinen absorbiert werden. Aber weder die 1400 noch die 1125 cm^{-1} -Bande entstehen durch Schwingungen des Proteingerüsts. Beide können von Absorptionen, wie z.B. die COO^- -Bande von der Carboxylgruppe der Fettsäuren, überlagert werden und sind daher für die Proteinbestimmung ungeeignet.

Diese Methode ist noch auf ein weiteres Bandenpaar anwendbar. Die Bande bei 1370 cm^{-1} , von den Nickschwingungen der CH_2 -Gruppe hervorgerufen, läßt sich sowohl bei Glucose, wie auch bei den Bluteiweißen und Lipiden beobachten, während die Schwingungen der CH_3 -Gruppe bei Glucose fehlen. Wird nun die Extinktion der 1370 cm^{-1} -Bande gegen die der CH_3 -Gruppen bei 1470 cm^{-1} gemessen, erhält man die Glucosekonzentration. Der Vorteil der Blutzuckermessung mit diesem Bandenpaar liegt in der Berücksichtigung der Lipidabsorption. Die Überlagerung mit der Harnstoffabsorption bei 1470 cm^{-1} muß als Nachteil gesehen werden. Bei Verdacht auf Niereninsuffizienz, kann die Harnstoffkonzentration bei 1617 cm^{-1} bestimmt werden.

Ein von Kisner et al. in [29] vorgeschlagenes Computerprogramm erlaubt die Konzentrationsbestimmung von drei sich überlagernden Substanzen. Hierbei sind bis zu fünfzehn Messungen im Bereich der gemeinsamen Bande vorzunehmen. Damit gelang es ihnen, die Konzentration von drei Serumlipiden bei der gemeinsamen Carbonylbande um 1740 cm^{-1} zu bestimmen.

Es ist möglich, dieses Verfahren bei Messungen der 1109 cm^{-1} -Absorption anzuwenden. Diese Bande eignet sich zur Blutzuckerbestimmung besonders gut. Sie spricht auf Glucoseerhöhung am stärksten an und überschneidet sich nur mit der Hämoglobinabsorption. Außerdem wird diese Absorption von der endocyclischen (C-O-C)-Schwingung verursacht und stellt somit die, gegenüber der CO-Schwingung, spezifischere Bande dar. Das Ergebnis einer derartigen Messung steht dabei aber erst nach fünf Minuten fest und ist deshalb in der jetzigen Form nicht optimal.

Die Untersuchung des spektralen Verhaltens von Harnstoff brachte eine neue Anwendungsmöglichkeit des Sensors hervor. Es konnte eine spezifische Absorptionsbande mit einem Maximum bei 1617 cm^{-1} nachgewiesen werden. Da Harnstoff das einzige primäre Amid ist, das im Blut in so hoher Konzentration vorkommt, sind Störungen der Messung durch Überlagerung von Absorptionen nicht wahrscheinlich. Damit eignet sich diese Bande zur Messung der Harnstoffkonzentration. Es ist denkbar, einen solchen Sensor in einen Dialysator einzubauen und zum "monitoring" der Dialyse heranzuziehen. Bei entsprechender Wellenzahl und geeigneter Anwendung der o.a. Meßmethoden kann man auch die Konzentration der Gesamteiweiße, des Hämoglobins, der α - β -Globuline und des γ -Globulins bestimmen.

Literaturliste

- [1] Afanas'ev V.A., Strel'tsova I.F.; "Infrared spectroscopy of aqueous solutions of carbohydrates and amino acids.", Zh. Fiz. Khim. 39, S. 110-115 (1965)
- [2] Arrondo J.L.R., Goni F.M., Macarulla J.M; "Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension: A study of the phosphate group vibrations", Biochim. Biophys. Acta 794, S. 165-168 (1984)
- [3] Bessmann S.P., Schultz R.D.; "Sugar electrode sensor for the artificial pancreas", Horm. Metab. Res. 4, S. 413-417 (1972)
- [4] Bessmann S.P., Schultz R.D., Layne E.C.; "Continuous extracorporeal monitoring of animal blood using the glucose electrode", Diabetes 25, S. 81-89 (1976)
- [5] Brauner H., Müller G.; "Glucosebestimmung - Stand und Perspektiven", Biomed. Techn. 25, S. 26-32 (1980)
- [6] Brügel W.; "Einführung in die Ultrarotspektroskopie"; S. 11 ff, 4. Aufl., Steinkopff-Verl., Darmstadt (1969)
- [7] Brügel W.; "Einführung in die Ultrarotspektroskopie", S. 190, 1. Aufl., Steinkopff-Verl., Darmstadt (1954)
- [8] Buddecke E.; "Grundriss der Biochemie", S. 162, 6. Aufl., de Gruyter, Berlin (1980)
- [9] Buijs K., Choppin G.R.; "Near infrared studies of the structure of water", J. Chem. Phys. 39, S. 2035-2042 (1963)

- [10] Cabassi F., Casu B., Perlin A.S.; "Infrared absorption and Raman scattering of sulfate groups of heparin and related glucosaminoglycans in aqueous solution", Carbohydr. Res. 63, S. 1-11, (1978)
- [11] Cael J.J., Koenig J.L., Blackwell J.; "Raman spectroscopy of crystalline α - and β -D-glucose", Carbohydr. Res. 32, S. 79-91 (1974)
- [12] Chang K.W., Aisenberg S., Soeldner J.S., Hiebert J.M.; "Validation and bioengineering aspects of an implantable glucose sensor", Trans. Am. Soc. Artif. Int. Org. 19, S. 352-360 (1973)
- [13] Goulden J.D.S.; "Infrared spectroscopy studies of aqueous solutions", Spectrochim. Acta 9, S. 657-671 (1959)
- [14] Gendreau R.M., Jacobsen R.J.; "Fourier transform infrared spectroscopy of protein absorption from whole blood: Ex vivo dog studies", Appl. Spectr. 35, S. 353-357 (1981)
- [15] Günzler H., Böck H.; "IR-Spektroskopie - Eine Einführung", S. 177 ff, 2. Aufl., Verl. Chemie, Weinheim (1983)
- [16] Günzler H., Böck H.; "IR-Spektroskopie - Eine Einführung", S. 228 ff, 2. Aufl. Verl.-Chemie, Weinheim (1983)
- [17] Günzler H., Böck H.; "IR-Spektroskopie - Eine Einführung", S. 234, 2. Aufl., Verl. Chemie, Weinheim (1983)

- [18] Günzler H., Böck H.; "IR-Spektroskopie - Eine Einführung", S. 208, 2. Aufl., Verl. Chemie, Weinheim (1983)
- [19] Günzler H., Böck H.; "IR-Spektroskopie - Eine Einführung", S. 320, 2. Aufl., Verl. Chemie, Weinheim (1983)
- [20] Hediger H.J.; "Infrarotspektroskopie: Grundlagen, Anwendungen, Interpretationen", S. 3, Akad.-Verl.-Gesellschaft, Frankfurt a.M. (1971)
- [21] Hediger H.J.; "Infrarotspektroskopie: Grundlagen, Anwendungen, Interpretationen", S. 68, Akad. Verl.-Gesell., Frankfurt a. M. (1971)
- [22] Hepp K.D.; "Auf dem Weg zum künstlichen Pankreas" in: "Den Diabetes beherrschen"; S.22-25, Bund diab. Kinder und Jugendliche e.V., (Editor) Gerhards + Co Verlag (1981)
- [23] Hineno M.; "Infrared spectra and normal vibrations of β -D-glucopyranose", Carbohydr. Res. 56, S. 219-227 (1977)
- [24] Kadish A.H.; "Automation control of blood sugar. A servomechanism for glucose monitoring and control", Trans. Am. Soc. Artif. Int. Org. 9, S. 363-367 (1963)
- [25] Kaiser N.; "Laser-Absorptions-Spektroskopie mit einer ATR-Platte" in: "Laser 77 Opto-Electronics Conference Proceedings", S. 543-551, Waidelich W. (Ed.), IPC Science and Technology Press d+d; Guildford (1977)
- [26] Kaiser N.; "Bloodless blood test under development; infrared spectroscopy is the secret", Electronics 51, S. 76-77 (1978)

- [27] Kaiser N.; "Laser absorption spectroscopy with an ATR-Prism", IEEE Trans. Biomed. Eng., Vol. BME-26, S. 597-600, (1979)
- [28] Kikuchi M., Arai T., Nakasu E., Sano A.; "Laser absorption spectroscopy for blood glucose measurement", in: "4th Congress of the International Society for Laser Surgery", 23.-27. Nov. 1981, S. 16.5-16.8, Japan (1981)
- [29] Kisner H.J., Brown C.W., Kavarnos G.J.; "Multiple analytical frequencies and standards for the least-squares spectrometric analysis of serum liquids", Anal. Chem. 55, S. 1703-1710 (1983)
- [30] Kraus G., Maier M.; "Infrared absorption spectroscopy of aqueous solutions with a CO₂-laser", Appl. Phys. 7, S. 287-293 (1975)
- [31] Kruse-Jarres J.D.; "Die Überwachung diabetischer Stoffwechselentgleisungen und ihrer Therapie durch kontinuierliche Glucose-regulierung", Intensivmed 11, S. 277-283 (1974)
- [32] Kruse-Jarres J.D.; "Künstliches endokrines Pankreas", J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, S. 457-463(1979)
- [33] Laulicht I., Pinchas S., Petreanu E., Samuel D.; "The infrared absorption spectrum of O-labelled urea", Spectrochim. Acta 21, S. 1487-1494 (1965)
- [34] Löffler G., Petrides P.E., Weiss L., Harper H.A.; "Physiologische Chemie", S. 111 ff., 2. Aufl., Springer-Verl. Berlin (1979)

- [35] Mathlouthi M., Vinh Luu D.; "Laser-Raman spectra of β -glucose and sucrose in aqueous solution", Carbohydr. Res. 81, S. 203-212 (1980)
- [36] Mecke R.; "Infra-red spectra of water", Current Sci. 30, S. 43-44 (1961)
- [37] Melki G.; "Etude comparative en spectrographie infrarouge de quelques hémoglobines humaines et animaux entre 4000 et 400 cm^{-1} ", Biochim. 53, S. 625-634 (1971)
- [38] Palm K.; Z. "IR-Spektrenanalyse von Plasmaproteinen; Lösungsmittelinduzierte Konformationsänderungen an Albumin und γ -Globulin", Z. Chem. 5, S. 462-463 (1965)
- [39] Palm K.; "Zur Infrarot-Spektralanalyse an Humanserum", Acta biol. med. german 17, S. 831 (1966)
- [40] Paquette J., Jolicoer C.; "A near infrared study of the hydration of various ions and nonelectrolytes", J. Solution Chem. 6, S. 403-427 (1977)
- [41] Ressler N., Ziauddin; "An improved technique for the near infrared study of water binding by proteins", Biochim. Biophys. Acta 295, S. 30-36 (1973)
- [42] Robertson C.W., Curnutte B., Williams D.; "The infra-red spectrum of water", Mol. Phys. 28, S. 183-191 (1973)

- [43] Robertson C.W., Williams D.; "Lambert Absorption Coefficients of water in the infrared", J. Opt.Soc. Am. 61, S. 1316-1320 (1971)
- [44] Schadewaldt H.; "Die Geschichte des Diabetes" in: "Diabetes im Bild"; S.9-20, Hoechst AG, (1972)
- [45] Shichiri M; Kawamori R., Hakui N., Yamasaki Y., Abe H.; "Wearable-type artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor", Lancet, S. 1129-1131 (1982)
- [46] Shichiri M; Kawamori R., Hakui N., Yamasaki Y., Abe H.; "Closed-loop glycemic control with a wearable artificial endocrine pancreas", Diabetes 33, S. 1200-1203 (1984)
- [47] Simons W.W.: The Sadtler Handbook of Infrared Spectra; Ed.: Sadtler Research Laboratories Inc. Co-publ. by Heyden a. Son Ltd., London N.W. 4, England 2 JQ, Spectrum-Nr. 1871 (1978)
- [48] Simons W.W.; "The Sadtler Handbook of Infrared Spectra", Ed.: Sadtler Research Laboratories Inc., Co-publ. by Heyden a. Son Ltd., London N.W. 4, England 2 JQ., Spectrum Nr. 2415 (1978)
- [49] dto 48, Spectrum Nr. 1780
- [50] Stewart R.D., Skelly N.E., Erley D.S.; "Infrared analysis of serum protein", J. Lab. & Clin. Med. 56, S. 391-400 (1960)
- [51] Twardowski J., Nowak I., Stufkens D.J., Snoeck T.L.; "Raman and infrared studies of homogeneous forms of acid phosphatase from rat liver", Biochim. Biophys. Acta 790, S. 70-77 (1984)

- [52] Vandermeulen D.L., Ressler N.; "A near infrared analysis of water-macromolecule interactions: Hydration and the spectra of aqueous solutions of intact proteins", Arch. Biochem. Biophys. 199, S. 197-205 (1980)

- [53] Vasko P.D., Blackwell J., Koenig J.L.; "Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates", Carbohydr. Res. 23, S. 407-416 (1972)

- [54] Wall T.T., Hornig D.F.; "Raman intensities of HDO and structure in liquid water", J. Chem. Phys. 43; S. 2079 (1965)

- [55] Wallach D.F.H., Zahler P.H.; "Infrared spectra of plasma membrane and endoplasmatic reticulum of Ehrlich ascites carcinoma", Biochim. Biophys. Acta 150, S. 186-193 (1968)

- [56] Yamatera H., Fitzpatrick B., Gordon G.; "Near infrared spectra of water and aqueous solutions", J. Mol. Spectros. 14, S. 268-278 (1964)

Lebenslauf

Am 29. März 1955 wurde ich als ältester Sohn von insgesamt 3 Kindern des Postbeamten Hermann Zeller und seiner Ehefrau Hedwig in Freiburg im Breisgau geboren. Nach der Grundschule in Bad Krozingen (Kreis Freiburg) besuchte ich das Rotteck-Gymnasium in Freiburg, wo ich im Juni 1975 das Abitur bestand.

Bis 1977 leistete ich meinen Zivildienst im St. Josefskrankenhaus in Freiburg ab. Anschließend überbrückte ich die restliche Wartezeit auf den Studienplatz als Krankenpfleger in o.g. Krankenhaus. Im Frühjahr 1981 erhielt ich meine Zulassung zum Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Albert-Universität in Freiburg. Zum 2.ten vorklinischen Semester wechselte ich nach München und war bis zum WS 86/87 an der Ludwig-Maximilian-Universität immatrikuliert. Dort bestand ich im April 87 den Dritten Abschnitt der Ärztliche Prüfung und erhielt die Approbation als Arzt.

